



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین

دانشکده پزشکی

پایان نامه

جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی

عنوان:

بررسی فراوانی بتالاکتامازهای با طیف گسترده تیپ های OXA، GES-۱ و VEB-۱ و تیپ بندی مولکولی آنها
به روش REP-PCR در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان های شهرهای قزوین و تهران

استاد راهنما: جناب آقای دکتر امیر پیمانی

استاد مشاور: جناب آقای دکتر امیر جوادی

نگارش: سحر امیرکمالی

شماره ثبت:

سال فراغت از تحصیل:

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

تقدیم:

اگر مردم را رسم چنان است که با تقدیم تلاش هایشان به بزرگان به آنها تقرب جویند، شایسته است ثمره تحصیل پیشکش تواضعانه ای باشد به نخستین معلمان زندگیم

پدر و مادرم

که علیرغم تحمل سختی ها و دشواریهای فراوان، مسیر کسب دانش و معرفت را برایم هموار نموده و از دعای خیرشان بی نصیب نبوده ام.

تشکر:

تشکر و سپاس بی پایان مخصوص خدایی است که بشر را آفریده و به او قدرت اندیشیدن داده و تواناییهای بالقوه را در وجود انسان قرار داده و او را امر به تلاش و کوشش نموده و راهنمایی را برای هدایت بشر فرستاده است.

با تشکر از، اساتید بزرگوارم،

جناب آقای دکتر امیر پیمانی

جناب آقای دکتر تقی ناصرپور

سرکار خانم دکتر معصومه اصلانی مهر

فهرست مطالب

۱	چکیده
۲	فصل اول
۳	۱-۱- خصوصیات سودوموناس آئروژینوزا
۴	۲-۱- تاریخچه سودوموناس
۴	۳-۱- تاکسونومی
۵	۱-۳-۱- مورفولوژی و فیزیولوژی
۶	۲-۳-۱- ساختمان غشاء سودوموناس آئروژینوزا
۹	۳-۳-۱- زیستگاه
۹	۴-۳-۱- ویژگی‌های کشت
۱۲	۵-۳-۱- رنگدانه
۱۲	۶-۳-۱- ساختار ژنتیکی این ارگانیسم
۱۳	۷-۳-۱- ساختمان آنتی ژنی ارگانیسم
۱۳	۸-۳-۱- بیوفیلم
۱۴	۹-۳-۱- کوئوروم سنسینگ
۱۴	۱۰-۳-۱- فاکتور های بیماری‌زایی
۱۶	۱-۱۰-۳-۱- پبلی
۱۶	۲-۱۰-۳-۱- کپسول پلی‌ساکاریدی
۱۶	۳-۱۰-۳-۱- آلزینات
۱۷	۴-۱۰-۳-۱- اندوتوکسین
۱۷	۵-۱۰-۳-۱- لکوسیدین
۱۷	۶-۱۰-۳-۱- پیوسیانین
۱۷	۷-۱۰-۳-۱- لیپوپلی ساکارید
۱۸	۸-۱۰-۳-۱- آگزوتوکسین A
۱۸	۹-۱۰-۳-۱- آگزوانزیم S و T
۱۸	۱۰-۱۰-۳-۱- سیستم ترشحی تیپ III
۱۹	۱۱-۱۰-۳-۱- آنزیم ها
۱۹	۱۲-۱۰-۳-۱- الاستاز
۱۹	۱۳-۱۰-۳-۱- آلکالین پروتئاز
۲۰	۱۴-۱۰-۳-۱- فسفولیپاز C
۲۰	۱۵-۱۰-۳-۱- رامنولپید
۲۰	۱۱-۳-۱- یافته‌های بالینی

۲۱	۱-۱۱-۳-۱- باکتری می
۲۲	۲-۱۱-۳-۱- عفونت استخوان و مفاصل
۲۲	۳-۱۱-۳-۱- عفونت سیستم عصبی مرکزی
۲۲	۴-۱۱-۳-۱- عفونت گوش
۲۳	۵-۱۱-۳-۱- عفونت چشم
۲۳	۶-۱۱-۳-۱- عفونت دستگاه گوارش
۲۳	۷-۱۱-۳-۱- اندوکاردیت عفونی
۲۳	۸-۱۱-۳-۱- عفونت های دستگاه تنفسی
۲۴	۹-۱۱-۳-۱- عفونت های پوست و بافت نرم
۲۴	۱۰-۱۱-۳-۱- عفونت های دستگاه ادراری
۲۵	۱۲-۳-۱- تشخیص آزمایشگاهی
۲۵	۱-۱۲-۳-۱- نمونه ها
۲۵	۲-۱۲-۳-۱- گستره ها
۲۵	۳-۱۲-۳-۱- کشت
۲۶	۴-۱۲-۳-۱- جداسازی سویه های سودوموناس آنروژینوزا
۲۶	۵-۱۲-۳-۱- اهمیت روشهای مولکولی
۲۷	۶-۱۲-۳-۱- روش های تایپینگ
۲۸	۱-۶-۱۲-۳-۱- فنوتایپینگ
۲۸	۱-۱-۶-۱۲-۳-۱- بیو تایپینگ
۲۸	۲-۱-۶-۱۲-۳-۱- سرو تایپینگ
۲۹	۳-۱-۶-۱۲-۳-۱- باکتریوسین تایپینگ
۲۹	۴-۱-۶-۱۲-۳-۱- آنتی بیوگرام
۲۹	۲-۶-۱۲-۳-۱- ژنوتیپینگ
۳۰	۱-۲-۶-۱۲-۳-۱- انواع روشهای ژنوتیپینگ از نظر هدف آن
۳۱	۲-۲-۶-۱۲-۳-۱- انواع روشهای ژنوتیپینگ از نظر انجام کار
۳۲	۳-۲-۶-۱۲-۳-۱- توالیابی کامل ژنوم
۳۳	۴-۲-۶-۱۲-۳-۱- هدف قرار دادن توالیهای تکراری ژنوم
۳۳	۵-۲-۶-۱۲-۳-۱- توالیابی مستقیم یک یا چند منطقه ژنتیکی
۳۴	۶-۲-۶-۱۲-۳-۱- PCR
۳۵	۷-۲-۶-۱۲-۳-۱- REP-PCR
۳۵	۷-۱۲-۳-۱- آزمایشهای ژنتیکی و سرولوژیک
۳۵	۸-۱۲-۳-۱- سایر روشهای تشخیصی
۳۶	۱۳-۳-۱- حساسیت نسبت به عوامل مختلف
۳۶	۱-۱۳-۳-۱- حساسیت نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی
۳۶	۲-۱۳-۳-۱- حساسیت در برابر آنتی بیوتیک

۳۷	۳-۱۳-۳-۱-مقاومت دارویی چند گانه در سودوموناس آئروژینوزا
۳۸	۳-۱-۱۴-آنتی بیوتیک ها
۳۸	۳-۱-۱۴-آنتی بیوتیک های غیربتالاکتام
۳۸	۳-۱-۱۴-آنتی بیوتیک های بتالاکتام
۴۱	۳-۱-۲-۱-پنی سیلین ها
۴۱	۳-۱-۲-۲-سفالوسپورین ها
۴۲	۳-۱-۲-۳-کارباپنم ها
۴۲	۳-۱-۲-۴-منوباکتام ها
۴۲	۳-۱-۳-۱-بتالاکتامازها
۴۳	۳-۱-۳-۱-طبقه بندی بتالاکتامازها
۴۴	۳-۱-۱۵-مقاومت آنتی بیوتیکی
۴۴	۳-۱-۱۵-چگونگی ایجاد مقاومت آنتیبیوتیکی
۴۵	۳-۱-۱۶-منشاء مقاومت دارویی
۴۵	۳-۱-۱۶-۱-منشاء ژنتیکی
۴۵	۳-۱-۱۶-۲-مقاومت کروموزومی
۴۶	۳-۱-۱۶-۳-مقاومت خارج کروموزومی
۴۶	۳-۱-۱۶-۴-منشاء غیرژنتیکی
۴۶	۳-۱-۱۷-روش دیسک دیفیوژن آگار
۴۷	۳-۱-۱۷-۱-تست های تاییدی
۴۷	۳-۱-۱۸-سایر آنتی بیوتیک ها
۴۸	۳-۱-۱۹-اپیدمیولوژی
۴۹	۳-۱-۲۰-درمان عفونت های سودوموناس آئروژینوزا
۵۱	فصل دوم
۵۲	۲-۱-هدف اصلی
۵۲	۲-۲-اهداف فرعی
۵۲	۲-۳-اهداف کاربردی
۵۳	۲-۴-سوال های پژوهش
۵۴	فصل سوم
۵۵	۳-۳-بررسی متون
۵۸	فصل چهارم
۵۹	۴-۱-نوع پژوهش
۵۹	۴-۲-جامعه مورد مطالعه
۶۰	۴-۳-واحد پژوهش
۶۰	۴-۴-متغیرها
۶۰	۴-۵-روش انتخاب نمونه

۲-۵- توزیع فراوانی ایزوله‌های جمع‌آوری شده بر اساس جنسیت و نوع نمونه بالینی	۷۷
۳-۵- توزیع فراوانی ایزوله‌های جمع‌آوری شده بر اساس بخش جدا شده	۷۸
۴-۵- تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا	۷۹
۵-۵- تعیین حساسیت آنتیبیوتیکی	۸۰
۱-۵-۵- نتایج آزمون تأییدی تولید ESBL	۸۰
۶-۵- آزمایش PCR برای جدا سازی ژنهای کد کننده	۸۱
۷-۵- تعیین توالی	۸۳
۸-۵- REP-PCR	۸۶
فصل ششم	۹۰
۱-۶- بحث	۹۱
۲-۶- نتیجه گیری	۹۴
۳-۶- پیشنهادات	۹۴
References	۹۵

فهرست جداول

جدول ۱-۱- گروه‌بندی سودوموناسها بر اساس هومولوژی rRNA و خصوصیات افتراقی	۵
جدول ۲-۱- فاکتورهای ویروالانس (بیماری‌زایی) مرتبط با سودوموناس آنروژینوزا	۱۵
جدول ۴-۱: متغیرها	۵۷
جدول ۲-۲: پرایمرهای مورد استفاده آزمون PCR	۶۹
جدول ۴-۳: حجم و غلظت نهایی مواد PCR برای ژنهای <i>bla_{GES-1}</i> و <i>bla_{VEB-1}</i> ، <i>bla_{OXA}</i>	۷۰
جدول ۴-۴: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن های <i>bla_{OXA}</i> ، <i>bla_{GES-1}</i> و <i>bla_{VEB-1}</i>	۷۱
جدول ۴-۵: پرایمرهای بکار رفته جهت انجام REP-PCR	۷۵
جدول ۴-۶: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت انجام REP-PCR	۷۵
جدول ۵-۱ : جدول فراوانی ایزوله های سودوموناس آنروژینوزای جمع آوری شده بر حسب بخش بیمارستانی	۷۹
جدول ۵-۲: بررسی غربالگری ایزوله های مولد ESBL در ایزوله های سودوموناس آنروژینوزای جدا شده در این مطالعه.	۸۰
جدول ۵-۳ : فراوانی ژنهای <i>bla_{OXA}</i> ، <i>bla_{VEB-1}</i> و <i>bla_{GES-1}</i> در ایزوله های سودوموناس آنروژینوزای مولد ESBL ...	۸۲
جدول ۵ - ۴ : توزیع فراوانی نمونه‌های ایزوله های سودوموناس آنروژینوزای حامل ژنهای <i>bla_{OXA-1}</i> ، <i>bla_{OXA-4}</i> ، <i>bla_{GES-1}</i> و <i>bla_{VEB-1}</i> بر حسب نوع نمونه بالینی	۸۵
جدول ۵-۵ : توزیع فراوانی ایزوله های سودوموناس آنروژینوزای حامل ژنهای <i>bla_{OXA-1}</i> ، <i>bla_{OXA-4}</i> ، <i>bla_{GES-1}</i> و <i>bla_{VEB-1}</i> بر حسب بخش های بیمارستان	۸۵
جدول ۶-۵ : نتایج حاصل از آزمون REP-PCR در ایزوله های سودوموناس آنروژینوزای مولد ESBL	۸۶
جدول ۷-۵ : فراوانی کلونهای جدا سازی شده مختلف حاصل از آزمون REP-PCR در مراکز بیمارستانی این مطالعه	۸۷
جدول ۵-۸ : توزیع فراوانی ژن <i>bla_{OXA-1}</i> در ایزوله های سودوموناس آنروژینوزای متعلق به کلون های جدا سازی شده در این مطالعه	۸۷
جدول ۴-۹ : توزیع فراوانی ژن <i>bla_{OXA-4}</i> در ایزوله های سودوموناس آنروژینوزای متعلق به کلون های جدا سازی شده در این مطالعه	۸۸
جدول ۵-۱۰ : توزیع فراوانی ژن <i>bla_{GES-1}</i> در ایزوله های سودوموناس آنروژینوزای متعلق به کلون های جدا سازی شده در این مطالعه	۸۸
جدول ۵-۱۱ : توزیع فراوانی ژن <i>bla_{VEB-1}</i> در ایزوله های سودوموناس آنروژینوزای متعلق به کلون های جدا سازی شده در این مطالعه	۸۹

فهرست تصاویر

- تصویر ۴-۱: دستگاه ترموسایکلر استفاده شده در مطالعه حاضر ۷۲
- تصویر ۴-۲: تانک الکتروفورز مورد استفاده در مطالعه حاضر ۷۴
- تصویر ۵-۱: نتیجه تست های بیوشیمیایی انجام شده در مطالعه حاضر ۷۹
- تصویر ۵-۲: تست تاییدی فنوتیپی جهت شناسایی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مولد ESBL ۸۱
- تصویر ۵-۳: نتیجه آزمون PCR مربوط به ژن های *bla_{OXA-۴}* و *bla_{VEB-۱}* در این مطالعه ۸۲
- تصویر ۵-۴: نتیجه آزمون PCR مربوط به ژن های *bla_{OXA-۱}* و *bla_{GES-۱}* در این مطالعه ۸۳
- تصویر ۵-۵ : Alignment ژن *bla_{OXA-۱}* ۸۴
- تصویر ۵-۶: نتیجه آزمون REP-PCR مربوط به نمونه های ESBL مثبت در این مطالعه ۸۶

فهرست نمودارها

- نمودار ۵-۱: توزیع فراوانی نسبی ایزوله های جمع آوری شده بر اساس جنسیت ۷۷
- نمودار ۵-۲: توزیع فراوانی نمونه های بالینی مختلف به کار رفته در این مطالعه ۷۸

چکیده

سابقه و هدف: سودوموناس آئروژینوزا یکی از شایع ترین پاتوژن بیمارستانی است. همراه با ظهور الگوهای مختلف مقاومت در برابر دارو، طیف گسترده β لاکتاماز (بتالاکتاماز طیف وسیع) به طور فزاینده به عنوان یک نگرانی بزرگ بالینی گزارش شده است. هدف اصلی از این مطالعه به منظور تعیین توزیع ژن های bla_{OXA} ، bla_{GES-1} و bla_{VEB-1} در میان ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا بود.

مواد و روش ها: در این مطالعه، در مجموع از ۱۷۶ ایزوله مولد ESBL از بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های آموزشی جمع آوری شد. تشخیص فنوتیپی ESBLs و تست حساسیت ضد میکروبی با توجه به دستورالعمل استاندارد های بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) انجام شد. PCR و تعیین توالی برای تشخیص ژن های bla_{OXA-1} ، bla_{OXA-2} ، bla_{OXA-4} ، bla_{OXA-10} ، bla_{GES-1} و bla_{VEB-1} استفاده شده است. ارتباط ژنتیکی ایزوله ها با استفاده از روش REP-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: در مجموع، ۱۳۶ (۷۸/۷٪) ایزوله مولد ESBL، الگوی مقاومت به چند دارو را نشان داد. bla_{OXA-1} (۳۶٪) رایج ترین ژن، به دنبال آن bla_{OXA-4} (۳۲٪)، bla_{GES-1} (۱۷٪)، و bla_{VEB-1} (۱۴٪) بود. یافته های REP-PCR سه ژنوتیپ مختلف نشان داده و شایع ترین ژنوتیپ موجود نوع A (۸۸٪) و پس از آن B (۷٪) و C (۴٪) بود.

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر حاکی از حضور قابل توجه بتالاکتامازهای وسیع الطیف مربوط به ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا است که نیاز به ایجاد استراتژی کنترل عفونت و درمانی در پیشگیری از انتشار بیشتر این ارگانیسم های مقاوم ضروری است. این اولین گزارش از ژن های bla_{OXA-4} و bla_{OXA-1} در سودوموناس جدا شده در ایران است.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، bla_{OXA} ، bla_{VEB-1} ، bla_{GES-1} ، REP-PCR

فصل اول

مقدمه و کلیات

کلیات

خانواده سودوموناسیه شامل مجموعه بزرگی از باسیل های گرم منفی می باشند. برخلاف انتروباکتریاسه، گونه های سودوموناس یک یا چند فلاژل قطبی دارند و معمولاً اکسیداز مثبت بوده و بر روی محیط های بسیار ساده می توانند رشد کنند. با این وجود چند سویه نیز تاژک های جانبی با طول متفاوت دارند. این باکتری ها غیراسپورزا، غیر اسید فست و هوازی اجباری هستند ولی برخی به صورت بی هوازی در حضور نیترات رشد می کنند. از نظر تغذیه ای احتیاجات غذایی خاصی نداشته و تقریباً همگی با نمک های آمونیوم و یک منبع کربن رشد می کنند.

از نظر متابولیسم، باکتری های این خانواده تنفسی بوده و دارای مکانیسم تخمیری نمی باشد. در دماهای بین ۴ درجه تا کمتر از ۴۳ درجه سانتی گراد رشد کرده، شیمیو ارگانو تروف بوده، کاتالاز مثبت و اکسیداز متغیر می باشند. در بین گونه های سودوموناس، تنها سودوموناس آئروژینوزا لیپاز مثبت می باشد. محتوای G+C در ژنوم آنها بین ۶۵ تا ۶۷٪ است. گونه های سودوموناس اغلب به آنتی بیوتیکها، مواد گندزدا، شوینده ها، فلزات سنگین و محلولهای آلی مقاوم هستند (۲۱).

این باکتری تازه های قطبی داشته، بسیاری از گونه ها پیگمان های برون سلولی محلول در آب تولید می کنند که در محیط کشت انتشار می یابد. گونه سودوموناس آئروژینوزا^۱، پیگمان سبز- آبی محلول تولید می کند. تحت شرایط مناسب، به ویژه در میزبان تضعیف شده، این باکتری عفونت های مجاری ادراری، عفونت های زخم و سوختگی، سپتی سمی، آبسه و مننژیت ایجاد می کند. سایر گونه های سودوموناس می توانند پیگمان های محلولی تولید کنند که دارای خاصیت فلورسانت بوده و تحت تاثیر نور فرابنفش درخشندگی خاصی را نشان می دهند. گونه های سودوموناس در خاک و سایر محیط ها فراوان بوده و به طور کلی تهدیدی برای سلامتی انسان به شمار نمی آیند (۳).

^۱ *P.aeruginosa*

۱-۲- تاریخچه سودوموناس

در سال ۱۸۵۰ یک جراح فرانسوی به نام Sedillot متوجه شد که در پارچه زخم بند سربازان مجروح چرک سبز-آبی تشکیل می‌شود. به همین دلیل Gessard در سال ۱۸۸۲ این باکتری جدا شده از زخم را *Bacillus pyocyaneus* نامید. Migula در سال ۱۹۰۰ *Pseudomonas* را به عنوان اسم جنس این باکتری (Pseudes: false; monas: unit) برگزید و آنرا *Pseudomonas pyocyanea* نامید. اما با این وجود نام *aeruginosa* (aeruginosus: Full of copper rust; i.e green) بیشتر مورد استفاده قرار گرفت و به عنوان اسم گونه پذیرفته شد (۴). سودوموناس آئروژینوزا در دهه ۱۹۶۰ به عنوان یک پاتوژن مهم مورد توجه قرار گرفت. علت این امر توانایی این باکتری در ایجاد عفونت در افراد دچار سوختگی، بیماران سیستمیک فیبروزیس و تمام بیمارانی است که سیستم ایمنی آن‌ها به هر علتی ضعیف شده است. امروزه سودوموناس آئروژینوزا به عنوان یک باکتری عامل عفونت‌های بیمارستانی مورد توجه می‌باشد. همچنین با توجه به پتانسیل این باکتری برای ایجاد مقاومت در برابر بسیاری از آنتی بیوتیک‌ها و توسعه ایزوله‌های مقاوم به چندین دارو (MDR^۲) در بیمارستان‌ها، تأثیر داروهای ضد باکتریایی کم‌رنگ‌تر شده است (۵).

۱-۳- تاکسونومی

جنس سودوموناس بر اساس هومولوژی rRNA به پنج گروه تقسیم شده است (جدول ۱-۱) و امروزه فقط گروه یک rRNA در جنس سودوموناس باقی مانده است و بقیه در جنس‌های جدیدی طبقه‌بندی شده‌اند (۶).

^۲ Multi-drug Resistance

Table 36.1 Key tests for medically important pseudomonads

rRNA homology group	Species	Distinguishing features
I <i>Pseudomonas</i>	Fluorescent on King's B agar	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (oxidase+) Arginine+, grows at 42 °C not 5 °C
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> (oxidase+) Arginine+, grows at 5 °C not 42 °C
		<i>Pseudomonas putida</i> (oxidase+) Arginine+, grows at 5 °C
	Non-fluorescent	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> (oxidase+) Glucose-, motile+
		<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (oxidase+) Glucose-, fructose+
		<i>Pseudomonas stutzeri</i> (oxidase+) NO ₃ +, arginine-, maltose+
II <i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia cepacia</i> (oxidase+)	Arginine-, lysine+, R-colistin, gentamicin
	<i>Burkholderia pseudomallei</i> (oxidase+)	Arginine+, lysine-, grows at 42 °C, R-colistin, gentamicin
	<i>Burkholderia mallei</i> (oxidase±)	Arginine+, motile-
	<i>Ralstonia pickettii</i> (oxidase+)	NO ₃ +, arginine-
	<i>Burkholderia gladioli</i> (oxidase-)	Lactose-, lysine-
III <i>Delftia</i>	<i>Delftia acidovorans</i> (oxidase+)	Asaccharolytic
IV <i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas diminuta</i> (oxidase+)	NO ₃ -, arginine-
	<i>Brevundimonas vesicularis</i> (oxidase+)	Aesculin hydrolysis
V <i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (oxidase-)	Maltose+, DNAase+, R-imipenem, gentamicin

Principles and Practice of Clinical Bacteriology Second Edition Editors Stephen H. Gillespie and Peter M. Hawkey
© 2006 John Wiley & Sons, Ltd

۱-۳-۱- مورفولوژی و فیزیولوژی

سودوموناس آئروژینوزا، متحرک و استوانه‌ای شکل و اندازه تقریبی آن، ۲-۶/۰ میکرومتر است. این ارگانیزم، گرم منفی است و به صورت‌های منفرد، جفتی و گاهی در زنجیره‌های کوتاه وجود دارد. توسط یک فلاژل قطبی متحرکند و در ۳٪ موارد بیش از یک فلاژل در قطب‌ها دیده می‌شود. این باکتری دارای کپسول آگرو پلی‌ساکاریدی موکوتیدی است و در بسیاری از محیط‌های کشت، به آسانی رشد می‌کند، گاهی بوی مطبوع یا شبیه انگور ایجاد می‌کند. اکسیژن مولکولی برای حرکت آن‌ها ضروری است. بنابراین حرکت درون آگار نیمه جامد روش مناسبی برای تست تحرک نیست. سودوموناس آئروژینوزا هوازی اجباری است و اکسیژن گیرنده نهایی الکترون محسوب می‌شود. اگرچه گونه‌های سودوموناس هوازی اجباریند ولی می‌توانند در شرایط بی‌هوازی رشد کنند که در این

صورت نیترات و آرژینین به عنوان گیرنده نهایی الکترون می شوند. بجز مواقعی که در حضور نیترات رشد می کند و آن را به نیتريت احیا می نماید، در سایر موارد هوازی اجباری می باشد (۷). سودوموناس آئروژینوزا گلوکز و قندهای دیگر را به وسیله مسیر انتروڈئوف مصرف می کند ولی از مسیرهای دیگر اکسیداسیون گلوکز هم می تواند استفاده کنند (۸). سودوموناس آئروژینوزا قادر به تخمیر کربوهیدرات ها نیست، اما از لحاظ تغذیه انعطاف پذیر است و قادر به متابولیزه بیش از ۸۰ ماده آلی بوده و حتی بر روی ساده ترین محیط های کشت نیز قابل رشد می باشد. این خصوصیات متابولیکی، نقش سودوموناس آئروژینوزا را در طبیعت نمایان می سازد. این باکتری در آب و خاک یافت شده و در تجزیه مواد آلی نقش دارد. در سودوموناس آئروژینوزا، تست سیمون سیترات مثبت، آرژینین دهیدرولاز مثبت، لیزین دکربوکسیلاز منفی و اورنیتین دکربوکسیلاز منفی می باشد. در محیط کشت کلیگراآیرون آگار تولید H_2S نمی نماید. به دلیل تولید تری متیل آمین، محیط کشت سودوموناس آئروژینوزا مشخصا بوی میوه می دهند (۷).

۱-۳-۲- ساختمان غشاء سودوموناس آئروژینوزا

بیش از دو دهه است که مشخص شده غشاء خارجی سودوموناس آئروژینوزا نفوذ پذیری کمی دارد (حدود ۸٪ در قیاس با اشرشیا کولی). اما قدرت برون ده این باکتری بسیار بالاست، به طوری که می تواند ترکیباتی با وزن مولکولی ۳۰۰۰ دالتون را نیز عبور دهد. در صورتی که در اشرشیا کولی تنها مولکول های ۵۰۰ دالتونی توانایی برون رفت از غشاء را دارند (۹). غشاء خارجی سودوموناس آئروژینوزا نفوذپذیری کمی دارد، در حالیکه قدرت تراوشی آن بسیار بالاست. از مهم ترین مولکولهای تراوشی (opr^f) را می توان نام برد که در مقاومت به آنتی بیوتیک ها بسیار مؤثر است. حتی با وجود غشایی با نفوذ پذیری پایین، آنتی بیوتیک ها می توانند به مقدار کم وارد سلول گردند و به داخل سلول نفوذ کنند. در نتیجه، قدرت نفوذ پذیری این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف کاهش قابل توجهی پیدا می کند و این مسئله ممکن است به دلیل وجود پورین های ویژه در داخل لایه

^۲ Outermembrane protein F

خارجی^۴ باکتری باشد. بنابراین این امر نقش مهمی را در مقاومت ذاتی این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک های مختلف ایفا می کند (۱۰). پروتئین oprD از خانواده بزرگ کانال های اختصاصی غشاء خارجی در باکتری های گرم منفی می باشد (۱۱). oprD پروتئینی با وزن مولکولی ۴۵ تا ۴۹ کیلودالتون در غشاء خارجی سودوموناس آئروژینوزا شناخته شده است. ژن کد کننده oprD میان موقعیت ۷۱ و ۷۵ دقیقه در کروموزوم سودوموناس آئروژینوزای PAO۱ واقع شده و توسط نوکلئوتید ۱۳۳۲ bp کد می شود (۱۲). این پروتئین مشابه اعضای خانواده پورین هاست، این تشابه از ۴۱ تا ۵۸٪ متغیر بوده و ساختار فضایی کلی سایر پروتئین ها را داراست (۱۳). بر خلاف پروتئین پورین ompF در اشرشیا کولی، کانال تشکیل شده توسط oprD باریک تر بوده که باعث کاهش نفوذ پذیری غشاء خارجی در سودوموناس آئروژینوزا نسبت به اشرشیا کولی می شود (۱۴). علاوه بر کاربایتم ها، oprD به عنوان کانال اختصاصی برای اسید های آمینه بازی و برخی پپتیدهای کوچک عمل کرده و به عنوان پروتئین نیز عمل می کند (۱۲). بر اساس ساختار کریستالی اشعه X، این پروتئین یک منومر ۱۸ شاخه ای با ساختار β barrel است، که از ۹ لوپ تشکیل شده است (۱۵). لوپ های خارجی ۲ و ۳ به عنوان راه ورودی برای اسیدهای آمینه بوده و منطقه ای برای اتصال ایمین تعیین شده است. علاوه بر آن هر حذف یا جایگزینی در لوپ ۲ و ۳ که منجر به تغییر ساختمانی می شود می تواند منجر به مقاومت به ایمین پنم گردد (۱۶). لوپ ۳ احتمالاً یک کانال عبوری در طول oprD برای ایمین پنم است، اما منطقه اتصال مستقیم نیست (۱۲). مکانیسمی که به وسیله آن ایمین پنم به لوپ ۲ متصل شده، سپس از طریق لوپ ۳ عبور می کند هنوز مشخص نیست (۱۵). حذف در لوپ های ۳ و ۴ منجر به عدم بیان oprD در سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیا کولی می شود (۱۷). لوپ ۱، ۵، ۶، ۷ و ۸ در انتقال ایمین پنم درگیر نیستند. حذف لوپ های ۵، ۶ و ۸ منجر به افزایش حساسیت به بتالاکتام ها، کینولون ها، کلرامفنیکل و تتراسیکلین می شود که نشان دهنده این است که این ۳ لوپ احتمالاً تجمع داخل سلولی برخی آنتی بیوتیک ها را کاهش می دهند (۱۸). مقدار oprD می تواند اولین مکانیسم مقاومت آنتی بیوتیکی باشد که توسط فشار انتخابی کاربایتم ها القاء می شود. در حالیکه مقاومت های دیگر و چندگانه، هنگامی که سودوموناس آئروژینوزای دارای نقص oprD با فشار بیشتر کاربایتم ها مواجه شود می تواند ظاهر شود. سایر مکانیسم های

^۴ Cell wall

مقاومت، مانند پروتئین های متصل شونده به پنی سیلین (PBPs)، همزمان با موتاسیون های oprD، به عنوان مقاومت های اضافه شونده بر کاربایتم ها محسوب می شود. همان طور که فارا و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داده اند، PBPs در مقاومت به کاربایتم ها، از طریق اتصال به عوامل ضد میکروبی یا از طریق کاهش تنظیم بیان ژن oprD در ایزوله های بالینی سودوموناس آئروژینوزا نقش ایفا می کنند (۱۹). اسیدهای آمینه بازی نه تنها به صورت رقابتی در طول کانال oprD منتقل می شوند، بلکه بیان پروتئین oprD را نیز القاء می نمایند. هنگامیکه آرژنین، هیستیدین، گلوتامات یا آلانین به عنوان تنها منبع کربن یا نیتروژن استفاده می شوند، میزان رونویسی oprD، ۳/۵ تا ۵/۶ برابر نسبت به محیط حداقل که دارای سوکسینات باشد، افزایش می یابد. تنظیم کننده ای که به آرژنین پاسخ می دهد (ArgR) به منطقه ی اپراتور oprD متصل شده و بیان آن را در شکل وابسته به دوز تنظیم می کند. علاوه بر آرژنین، بیان oprD توسط سایر اسیدهای آمینه مانند: گلوتامات، هیستیدین و آلانین از طریق مسیر مستقل غیر وابسته به (ArgR) و ناشناخته تنظیم می گردد (۲۰). فلزهای کمیاب در تنظیم بیان oprD نقش مهمی دارند (۲۱). ایمنی پنم در حضور غلظت های کشنده ی روی در سودوموناس آئروژینوزا MIC بالایی دارد. در باکتری تیمار شده با روی مشاهده شده است که بیان پمپ افلاکس افزایش یافته و بیان پروتئین oprD کاهش می یابد. مس می تواند مقاومت به کاربایتم ها را تحت تاثیر قرار دهد. اما مکانیسم مقاومت به کاربایتم القاء شده توسط مس مانند روی نیست، علاوه بر سیستم تنظیمی czcSR، سیستم دو جزئی تنظیمی دیگر، copSR در تحمل سودوموناس آئروژینوزا نسبت به مس درگیر بوده و مسئول کاهش بیان oprD می باشد. بیان oprD توسط تنظیم کننده های دو جزئی مانند copSR، czcSR و parSR و MexT (تنظیم کننده ی پمپ افلاکس) سرکوب می شود. اخیراً، سیستم تنظیمی دو جزئی دیگری به نام parSR توصیف شده که مقاومت به ۵ کلاس آنتی بیوتیکی مانند ایمنی پنم، سفپیم، کولیستین، آمینوگلیکوزیدها و فلوروکینولون ها را در سودوموناس آئروژینوزا القاء می کند. این سیستم تنظیمی به نظر می رسد از طریق افزایش بیان MexXY، کاهش بیان oprD و تغییر Lps ها عمل می کند. سالیلات به عنوان یک اسید ضعیف نفوذ کننده به غشاء شناخته شده، که می تواند سنتز پروتئین های خاصی را در غشاء خارجی برخی از باکتری های گرم منفی سرکوب کند. این ماده می تواند MIC ایمنی پنم را تا ۱۶ برابر افزایش داده و بیان oprD را در سطح رونویسی تا ۳/۳ برابر کاهش دهد که بسیار مشابه تاثیراتی است که در سوشی با افزایش

بیان MexT دیده می شود. و این پیشنهاد دهنده آن است که سالیلات رونویسی oprD را تا حدودی از طریق MexT سرکوب می نماید(۲۲). بر عکس سالیلات ترکیبات پلی کاتیونی اسپرمین و اسپرمیدین به طور مستقیم کانال oprD را بلوک کرده و MIC ایمی پنم افزایش می دهد(۲۳).

اسیدهای آمینه بازی به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن، ArgR یا سایر تنظیم کننده ها را هدایت می کند تا به اپراتور ژن oprD متصل شده و بیان آن را افزایش دهد. بیان oprD توسط تنظیم کننده های دو جزئی مانند copSR, czcSR و parSR و تنظیم کننده های پمپ افلاکس MexT سرکوب می شود. این تنظیم کننده ها هم چنین بیان پمپ های افلاکس^۵ خاصی را افزایش می دهند(همان طور که در شکل نشان داده شده است). (مثبت به معنی افزایش و منفی به معنی کاهش است). اسیدهای آمینه بازی می توانند به طور مستقیم با کاربایتم ها برای نفوذ از طریق کانال oprD رقابت کنند. برخی مولکول ها مانند اسپرمین و اسپرمیدین می توانند کانال oprD را بلوک کنند و ورود کاربایتم ها را تحت تأثیر قرار دهند. سالیلات بیان oprD را از طریق تنظیم بیان MexT کاهش می دهند(۱۲).

وجود بتا لاکتاماز های پری پلاسمیک در غشاء و سیستم های تراوشی چند دارویی غشایی مانند RND-OprM- وجود بتا لاکتاماز های پری پلاسمیک در غشاء و سیستم های تراوشی چند دارویی غشایی مانند MexAB می توانند از عوامل مهم مقاومت ذاتی این باکتری به شمار روند(۱۰).

۱-۳-۳- زیستگاه

Anwar و Costerton سودوموناس آئروژینوزا را فراوان ترین شکل موجود زنده روی زمین نامیدند. این ارگانیسم از محیط های مختلفی مانند آب، خاک، مواد آلی پوسیده، سوخت هواپیماهای جت و محلول های ضد عفونی کننده جدا شده است که می تواند به دلیل توانایی ارگانیسم برای استفاده از ترکیبات آلی متفاوت و بقاء در حالت فقدان ظاهری مواد غذایی باشد. علاوه بر نواحی آلوده با فاضلاب به ندرت از آب دریا نیز جدا می شود(۲۴).

^۵ Efflux pump

حضور سودوموناس آئروژینوزا در افراد سالم نادر است. با این وجود می‌توان این باکتری را از مدفوع افراد سالم به میزان ۱-۱۵ درصد جدا کرد که وسعت این دامنه تحت تأثیر رژیم غذایی قرار دارد. به نظر می‌رسد کلونیزاسیون روده‌ای در افراد سالم حالتی گذرا دارد و با گذشت زمان سویه باکتری تغییر می‌کند. Cook و Buck دریافتند که قبل از تشخیص ارگانیزم در مدفوع داوطلبان، آن‌ها باید حداقل یک میلیون سودوموناس آئروژینوزا را بلعیده باشند. ولی این تعداد برای ایجاد عفونت کافی نیست. این مقاومت ذاتی نسبت به عفونت با تجویز آنتی بیوتیک ضعیف می‌شود و در نتیجه می‌توان چنین نمود که میزان کلونیزاسیون روده‌ای با بستری شدن بیمار در بیمارستان به شدت افزایش می‌یابد و این افزایش همبستگی نزدیکی به مدت بستری بیمار دارد (۲۴).

۱-۳-۴-ویژگی‌های کشت

سودوموناس آئروژینوزا به سهولت در روی محیط کشت معمولی آزمایشگاهی رشد می‌کند و اغلب به وسیله ظاهر کلنی روی آگار مغذی تشخیص داده می‌شود. معمولاً کلنی‌های مدور، نامنظم، پخش با قطر ۲-۳ میلی‌متر، با یک سطح مات و یک ساختار درونی فلوکولار و قوام کره‌ای تشکیل می‌دهد (تیپ یک کلنی). در بقیه موارد کلنی‌های کوچک‌تر، برجسته و شبیه کلی‌فرم‌ها (تیپ دوکلنی) و اشکال ناصاف، کلنی‌های نافی شکل و برجسته یا کاملاً چین دار (تیپ ۳ کلنی) هم تولید می‌کنند. کلنی‌های نوع ۱ و ۲ در محیط مایع سوسپانسیون یکنواخت تشکیل می‌دهند ولی کلنی‌های نوع ۳ یک سوسپانسیون گرانولی می‌سازد (۲ و ۲۴).

هیچ گونه تفاوت قابل تشخیصی در آنتی‌ژن‌های سوماتیک مقاوم به گرما، فاز، باکتریوسین یا حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها در بین انواع کلنی‌های مشاهده نشده است. برخلاف باکتری‌های روده‌ای سویه‌های دارای کلنی‌های زیر و ناصاف آنتی ژن‌های لیپو پلی ساکارید صاف تولید می‌کنند و با آنتی سرم‌های آنتی ژن O می‌توان آن‌ها را سروتایپ بندی نمود. تولید یک رنگدانه سبز-آبی که در محیط اطراف پخش می‌شود وجود سودوموناس آئروژینوزا را تأیید می‌کند، ولی در اغلب محیط کشت‌ها به جز روی محیط‌های ویژه‌ای پیوسیانین تولید نمی‌شود و برخی به طور کلی آنرا تولید نمی‌کنند. توانایی تولید پیوسیانین می‌تواند به طور غیرقابل برگشتی در کشت از دست برود. اغلب کشت‌های سودوموناس و نه همه آن‌ها یک بوی میوه‌ای مشخص دارند که به خاطر تولید O-آمینو استوفنون از تریتوفان است. روی محیط نوترینت آگار، بسیاری از کشت‌های سودوموناس آئروژینوزا به ویژه کلنی‌های تیپ

۱ و ۳ نقاط رنگین کمانی با یک جلای فلزی ایجاد می‌کنند زیرا این نقاط، کریستال‌هایی در کشت قابل رویت است و درون این نقاط ارگانسیم‌های لیز شده‌اند. این ضایعات شبیه پلاک روی آگار را Berk در سال ۱۹۶۳ اتوپلاک نامید. او پیشنهاد کرد که یک عامل لیز کننده قابل انتقال مسئول این پدیده است ولی دیگران باکتریوفاژ را علت آن می‌دانند. مطابق با نظر Zag و Sierrs این اتو لیز حاصل تولید آنزیم‌هایی است که سلول‌های مرده را تجزیه می‌کنند و کریستال‌ها نمک‌های اسیدهای چرب آزاد شده به وسیله اتولیز هستند.

سودوموناس آئروژینوزا به ترکیبات آمونیوم مثل برومید آمونیوم متیل فنیل (سیتیریماید) مقاوم است و از این خصوصیت در اغلب محیط‌های انتخابی برای جدا کردن ارگانسیم از انواع دیگر استفاده می‌شود. آگار سیتیریماید با نالیدیکسیک اسید و ایرگاسان در بازار به صورت تجارتي موجود است ولی برخی ایزوله‌های بیماران سیستمیک فیروزیس (CF) به شدت به این ترکیبات حساس هستند و روی این محیط رشد نمی‌کنند. براث غنی از استامید برای جدا کردن سودوموناس آئروژینوزا از مدفوع توصیه شده است (۲۴). سویه‌های موکوئیدی سودوموناس آئروژینوزا مقادیر فراوانی از یک پلی ساکارید خارج سلولی روی محیط کشت آگار تولید می‌کنند. این پلی ساکارید از نظر شیمیایی شبیه اسید آلترینیک است. یک کویلیم دارای بار منفی $D-\beta$ - مانورونیک اسید $(\beta 1-4)$ و $L-\alpha$ - گلوکورونیک اسید می‌باشد و به طور کلی آلترینات نامیده می‌شود.

Costerton, Briwn و Sturgess در سال ۱۹۷۰ پیشنهاد کردند که آلترینات یک کپسول نرم یا گلیکوکالیس است که در آن میکرو کلنی‌ها به دام می‌افتند و این مشارکت آلترینات و سلول‌های باکتری اساس تشکیل بیوفیلم می‌باشد و باعث محافظت سلول در برابر محیط‌های خارجی مثل کمپلمان، آنتی بیوتیک‌ها می‌گردد. آلترینات در جانوران و انسان آنتی‌ژنیک است و می‌توان آنتی بادی مربوطه را به وسیله تست الیزا و اپسونوفاگوسیتی اندازه گرفت. این پلیمر از نظر آنتی‌ژنی در بین گونه‌ها حفاظت شده است. آلترینات در سویه‌های غیر موکوئیدی هم تولید می‌شود ولی از نظر انرژی بسیار پرهزینه است. دسته‌ای از ژن‌ها در حداقل سه لوکوس کروموزومی، تنظیم و سنتز آلترینات را کنترل می‌کنند و این‌ها تحت تأثیر فاکتورهای محیطی، فشار اسمزی، دهیدراسیون اتانول، فشار اکسیژن و کمبود نیتروژن هستند. افزایش قدرت یونی ترشحات اگزوکرین بیماران سیستمیک فیروزیس که به دلیل بالا رفتن

یون‌های سدیم کلرید و کلسیم و محدودیت آهن، فسفات، کرین ایجاد می‌شود نیز در ظهور شکل موکوئیدی مؤثر است (۲۴).

۱-۳-۵-رنگدانه

سودوموناس آئروژینوزا در گروه I سودوموناسیه و در زیر گروه فلورسنت rRNA قرار می‌گیرد. مانند تمام باکتری‌های این زیر گروه، تولید پیگمانی با فلورسنت سفید تا سبز آبی در زیر چراغ وود (۴۰۰ نانومتر) می‌نماید که پیوردین نام دارد. البته سودوموناس آئروژینوزا در بیشتر موارد جدا شده از بیماران تولید پیگمان محلول در آب، به نام پیوسیانین نیز می‌نماید. در حضور این پیگمان، ترشحات حاوی سودوموناس آئروژینوزا، به رنگ سبز آبی دیده می‌شوند. بعضی از سویه‌ها رنگ فلورسنتی به نام فلورسین نیز تولید می‌نمایند. به دلیل تولید فلورسانس توسط باکتری، از لحاظ وجود عفونت با سودوموناس آئروژینوزا می‌توان پوست سوخته بیماران سوختگی را از زیر چراغ وود عبور داد و تکه‌های فلورسنت را جستجو کرد (۷).

برخی از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا یک رنگدانه قرمز روشن محلول در آب بنام پیوروبین تولید می‌کنند که به طور برگشت‌ناپذیری در غلظت کم اکسیژن به یک شکل بدون رنگ احیاء می‌گردند. پیوروبین یک رنگدانه فنازین غیر محلول در کلروفرم است که به وسیله ۲ درصد از ایزوله‌های بالینی تولید می‌شود که اکثریت آن‌ها از ادرار و خلط بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس جدا می‌شود (۲۴).

۱-۳-۶-ساختار ژنتیکی این ارگانیسم

بیماری‌زایی متنوع سودوموناس آئروژینوزا نشان می‌دهد که این باکتری دارای ژنوم منحصر به فردی است. تعیین توالی ژنوم ۲۰۰۰ سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفته نشان می‌دهد ژنوم آن‌ها از ۶/۳ میلیون جفت باز در ۵۵۷۰ ژن تشکیل شده است. ۸/۴٪ از این ژن‌ها، ژن‌های تنظیمی را شامل می‌شود و سودوموناس آئروژینوزا را با بیشترین تعداد ژن‌های اختصاصی برای تنظیم یک باکتری بیماری‌زا و سازگارپذیر، در محیط‌های نامساعد می‌سازد. کروموزوم این باکتری غنی از G+C (۵۰-۷۰ درصد) می‌باشد. ۱۰٪ از ژنوم آن متغییر است که در جزایر

بیماری‌زایی سازمان می‌یابد. جزایر فاکتورهای بیماری‌زای شناخته شده از جمله ExoU را کد می‌کنند، بدین ترتیب این جزایر، جزایر پاتوژنیسیته^۶ نامیده می‌شوند که بیشترین تنوع بیماری‌زایی را برای سودوموناس آئروژینوزا فراهم می‌کنند (۲۴).

۱-۳-۷- ساختمان آنتی‌ژنی ارگانیزم

سودوموناس آئروژینوزا از نظر آنتی‌ژنی گوناگون بوده و دارای انواع آنتی‌ژن‌های O، H و پیلی می‌باشد. تجزیه‌ی آنتی‌ژنی، بر اساس انواع پلی‌ساکارید O، وجود ۱۷ سروتایپ را مشخص کرده که با واکنش آگلوتیناسیون قابل شناسایی‌اند. آنتی‌ژن پروتئینی پوشش خارجی (OMP) در همه‌ی سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا وجود دارد و آنتی‌ژن مشترک گونه محسوب می‌شود. فاژ تایپینگ در این باکتری از لحاظ اپیدمیولوژیک و باکتریوسین تایپینگ مانند پیوسین تایپینگ در پی‌گیری انتشار اپیدمیک عفونت‌های بیمارستانی ارزش ویژه‌ای یافته است (۲۴).

۱-۳-۸- بیوفیلم^۷

معمولاً باکتری‌ها در طبیعت به صورت به هم چسبیده یافت می‌شوند. اجتماعات به هم چسبیده‌ی سلول‌ها بیوفیلم تشکیل می‌دهد. باکتری‌های تثبیت شده روی یک سطح همگی به وسیله‌ی یک ماتریکس از مواد پلیمری آلی با منشاء میکروبی (اگزوپلیمر گسترده گلیکوکالیکس) احاطه شده‌اند. این اگزوپلی‌ساکاریدها که بیش از ۹۰٪ وزن خشک بیوفیلم را تشکیل می‌دهند؛ باعث تسهیل اتصال به سطح، تشکیل میکروکلنی و مقاومت به مواد ضد میکروبی می‌شود. ساختار فیزیکی بیوفیلم‌ها از لایه‌های نازک حصیری مسطح تا ترکیبات شبه قارچی متغیر است. در برخی موارد بیوفیلم‌ها با یک گونه باکتری به وجود می‌آید که کشت تک (خالص) نامیده شده است، ولی بیوفیلم‌های تشکیل شده بر روی سطوح مخاطی مثل روده، ریه و غیره که بیشتر آمیزه‌ای از گونه‌های گوناگونی از باکتری‌ها می‌باشند کشت چند گانه نامیده می‌شود. از ویژگی‌های قابل ملاحظه‌ی زندگی گروهی در قالب بیوفیلم می‌توان به افزایش چشم‌گیر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسایدها، به علاوه سهولت انتقال ژن و اشتراک تولیدات

^۶ Pathogenesis Island

^۷ Biofilm

متابولیک در داخل اجتماعات بیوفیلیم به دلیل مجاورت نزدیک سلول‌ها اشاره کرد. آلزینات تولید شده توسط باکتری‌های گرم منفی مختلف از جمله سودوموناس آئروژینوزا عامل اصلی تولیدکننده‌ی بیوفیلیم می‌باشد (۲۴).

۱-۳-۹- کوئوروم سنسینگ^۸

مکانیسم ارتباط سلول به سلول در باکتری‌ها و میان‌کنش آن‌ها از طریق تبادل اطلاعات با سایر سلول‌ها کوئوروم سنسینگ نامیده می‌شود. یکی از تفاوت‌های باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت کنترل غلظت سلولی و بیان فاکتورهای بیماری‌زا از طریق سیگنال‌های شیمیایی کوئوروم سنسینگ می‌باشد. از جمله فرآیندهای فیزیولوژیکی تحت کنترل کوئوروم سنسینگ می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

بیولومینسانس، تولید متابولیت‌های ثانویه، تولید آنتی‌بیوتیک، سوارمینگ، تشکیل بیوفیلیم، حفاظت از مکانیسم دفاعی میزبان، اسپورولاسیون، تولید فاکتورهای ویروالانس و غیره. کوئوروم سنسینگ نقش مهمی در تشکیل بیوفیلیم دارد، به این دلیل کوئوروم سنسینگ و بیوفیلیم مرتبط به هم هستند. سیستم کوئوروم سنسینگ سودوموناس آئروژینوزا که از نوع تیپ LuxIR است، ویروالانس سودوموناس آئروژینوزا توسط دو سیستم تیپ lux مجزا از هم که las و rhl نام دارند کنترل می‌شود. نامگذاری این دو سیستم برگرفته از اثرگذاری آن‌ها بر روی تولید الاستاز (las) و رامنولیبید (rhl) است. سیستم las و rhl در پردازش و تولید فاکتورهای ویروالانس متعددی نقش دارند که عبارتند از: الاستاز، آلکالین پروتئاز، اگزوتوکسین A، رامنولیبیدها، پیوسیانین، لکترین‌ها و سوپراکسید دیسموتاز. مولکول‌های سیگنالینگ در سه گروه عمده طبقه‌بندی می‌شوند: آسیل هموسرین لاکتون‌ها^۹ (AHLs)، الیگوپپتیدها و LuxS/autoinducer ۲. تیپ‌هایی که از نظر شیمیایی به هم مرتبط اند با ارائه‌ی سیگنالینگ سلول به سلول یک مجموعه‌ی گسترده از مولکول‌های کاملاً متنوع از نظر ساختاری را تشکیل می‌دهد (۴).

۱-۳-۱۰- فاکتورهای بیماری‌زایی

سودوموناس آئروژینوزا پاتوژن فرصت طلبی است که خصوصاً در بیمارانی که از کاتتر استفاده می‌کنند و در بیماران دارای نقص ایمنی (نظیر نوتروپنی)، عامل ایجاد بیماری می‌باشد. سودوموناس آئروژینوزا ساختارها و

^۸ Quorum sensing

^۹ Acyl-homoserine lactones

فراورده های سلولی متعددی تولید می کند که با توانایی آن ها در ایجاد بیماری از طریق اعمال نقش های چسبندگی، حفاظت از فاگوسیتوز، تغییر پاسخ های ایمنی یا تخریب بافت های میزبانی مرتبط هستند (۲۵). به عبارت دیگر سودوموناس آئروژینوزا ویرولانس فاکتورهای متعددی دارد که شامل ترکیبات ساختمانی، توکسین و آنزیم های مختلف است که هر کدام از فاکتورها در بیماری چه نقشی بر عهده دارند مشکل است و شواهد نشان می دهند که ویرولانس این باکتری چند عاملی است (۲۶).

جدول ۱-۲- فاکتورهای ویرولانس (بیماری زایی) مرتبط با سودوموناس آئروژینوزا

کارکرد	فاکتورهای ویرولانس
پلی ساکارید موکوئیدی، ادهزین، جلوگیری از کشتار آنتی بیوتیک (مانند آمینوگلیکوزیدها)، مهار فعالیت نوتروفیل و لنفوسیت	کپسول
ادهزین	پیلی
فعالیت اندوتوکسینی	لیپو پلی ساکارید (LPS)
تحریک کارکرد مژه، تحریک پاسخ التهابی، واسطه ی تخریب بافتی با تولید رادیکال های اکسیژن سمی و افزایش ترشح اینترلوکین A	پوسیانین
جلوگیری از سنتز پروتئین، تولید آسیب بافتی، سرکوب کننده ی ایمنی	اگزوتوکسین A
جلوگیری از ساخت پروتئین، سرکوب کننده ی ایمنی	اگزوتوکسین S
سایتوتوکسیک برای غشاهای یوکاریوت (مانند تخریب عملکرد لوکوسیت، ایجاد آسیب مویرگ های ریوی)	سایتوتوکسین (لوکوسیدین)
تخریب بافت های حاوی الاستین (مانند رگ های خونی، بافت ریه، پوست)، کلاژن، ایمونوگلوبولین ها و فاکتورهای کمپلمان	الاستاز
تخریب بافتی، غیرفعال کردن اینترفرون و فاکتور نکروز دهنده ی توموری آلفا	آلکالین پروتئاز
همولیزین حساس به حرارت، واسطه ی تخریب بافتی، تحریک پاسخ التهابی	فسفولیپاز C
همولیزین مقاوم به حرارت، تخریب بافت های حاوی لسیتین، ممانعت از فعالیت مژه های ریوی	رامنولپید

۱-۳-۱۰-۱- پیلی:

بسیاری از سودوموناس آئروژینوزها تعداد زیادی پیلی تایپ ۴ را دارند. از سطح باکتری به خارج کشیده شده اند. این پیلی ها که با پیلی باکترئیدس نودوسوس^{۱۰}، موراکسلا بوویس^{۱۱}، نایسریا گونوره^{۱۲} و ویبریو کلرا^{۱۳} شباهت دارند موجب اتصال به موسین و سلول های اپی تلیال می شوند(۲۷).

۱-۳-۱۰-۲- کپسول پلی ساکاریدی

سودوموناس آئروژینوزا کپسول پلی ساکاریدی تولید می کند (غالباً به عنوان اگزوپلی ساکارید موکوئیدی، لایه آلزینات یا گلیکوکالیکس^{۱۴} شناخته شده) که چندین نقش دارد. این لایه پلی ساکاریدی به عنوان لنگر باکتری به سلول اپی تلیال و موسین ترانکوبرونشیال است. کپسول باعث حفاظت باکتری در برابر فاگوسیتوز شده و خاصیت ضد آنتی بیوتیکی مثل آمینوگلیکوزید دارد. ۸۰٪ بیمارانی که دچار فیروز سیستمیک هستند به علت سویه های سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده آلزینات به طرف عفونت های تنفسی پیشرفت می کنند. سیگنال های تنظیمی مهم برای سنتز آلزینات NaCl، KCl و عوامل خشک کننده هستند(۲۶).

۱-۳-۱۰-۳- آلزینات

یک اگزوپلی ساکاریدی موکوئیدی است که از ترکیب D مانورونیک اسید و L گلوکورونیک اسید با پیوند β ۴ (۱ و ۲) ساخته شده است (۲۸ و ۲۹). تولید این پلی ساکارید موکوئیدی تحت تنظیم پیچیده ای است. ژن های کنترل کننده تولید پلی ساکارید آلزینات، در بیماران از قبیل افراد مبتلا به سیستمیک فیروزیس یا دیگر بیماری های تنفسی

^{۱۰} *Bacteroides nodosus*

^{۱۱} *Moraxella bovis*

^{۱۲} *Neisseria gonorrhoeae*

^{۱۳} *Vibrio cholerae*

^{۱۴} *Glycocalix*

مزمّن فعال می شوند و این افراد مستعد کلونیزاسیون طولانی مدت با این سویه های موکوییدی سودوموناس آئروژینوزا هستند. (۳۰).

۱-۳-۱۰-۴- اندوتوکسین

اندوتوکسین لیپوپلی ساکاید در سودوموناس آنتیژن اصلی دیواره سلولی می باشد. قسمت لیپید A لیپوپلی ساکاید، فعالیت اندوتوکسیک دارد. شوک اندوتوکسیک در بیمارانی که دچار باکتری می سودوموناس هستند رخ می دهد. بیش از یک نوع آنتیژن O ممکن است بطور همزمان بیان شود (۳۱).

۱-۳-۱۰-۵- لکوسیدین

پروتئینی با وزن مولکولی ۲۷۰۰۰ دالتون است که برای لنفوسیت ها سمی میباشد و مانع فعالیت گلبولهای سفید در انجام فاگوسیتوز میشود، گفته میشود لکوسیدین می تواند پروتئین کیناز C را فعال کند (۳۲).

۱-۳-۱۰-۶- پیوسیانین

پیوسیانین، توکسین آبی رنگی است که توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید شده و ایجاد محصولات سمی اکسیژن مثل سوپراکساید و هیدروژن پراکساید را کاتالیز می کند. در حضور پیوچلین (آهن متصل به سیدروفور) رادیکال های هیدروکسیل بیشتری تولید می شود که موجب آسیب بافتی می شود. این پیگمان، محرک ترشح اینترلوکین A است و منجر به افزایش جذب نوتروفیل ها می شود (۱ و ۲۶).

۱-۳-۱۰-۷- لیپوپلی ساکاید

لیپوپلی ساکاید سودوموناس آئروژینوزا تشابه فراوانی با اندوتوکسین سایر باکتری های گرم منفی نشان می دهد. از جمله خواص تب زایی، واکنش شوآرتزمن و خاصیت کشندگی این ترکیب می باشد.

دلایل متعددی نشان دهنده اهمیت LPS سودوموناس آئروژینوزا در بیماریزایی این میکروارگانیسم است:

۱- آنتی بادی تولید شده بر ضد آن در مدل های تجربی مصونیت ایجاد می کند.

۲- موتانت های، فاقد زنجیره های جانبی O در مقایسه با سویه وحشی خود غیر ویرولان هستند.

۳- LPS باعث محافظت سلول های باکتری در مقابل اپسونیزاسیون و فاگوسیتوز می شود.

۴- باعث مقاومت نسبت به عملکرد باکتروساید کمپلمان در سرم انسانی طبیعی می شود (۳۱).

۱-۳-۱۰-۸- اگزوتوکسین A

یکی از مهم ترین فاکتورهای بیماری زایی تولید شده توسط سویه های بیماریزای سودوموناس آئروژینوزا است. این توکسین با روشی مشابه با توکسین دیفتری، سنتز پروتئین را در سلول های یوکاریوتیک مختل می کند. البته این دو توکسین از نظر ساختمانی و ایمونولوژیکی با هم تفاوت داشته و اگزوتوکسین A از توانایی کمتری نسبت به توکسین کورینه باکتریوم دیفتری^{۱۵} برخوردار است. این توکسین احتمالاً با نکروز پوستی ایجاد شده در زخم های سوختگی، آسیب قرینه در عفونت های چشم، و آسیب بافتی در عفونت های مزمن تنفسی مرتبط است. (۲۷).

۱-۳-۱۰-۹- اگزوتوکسین S و T

اگزوتوکسین S و T، توکسین خارج سلولی تولید شده توسط سودوموناس آئروژینوزا هستند. زمانی که سیستم ترشحی تیپ ۳، پروتئین ها را به داخل سلول های یوکاریوتیک وارد می کند، تخریب سلول های اپیتلیال رخ می دهد و گسترش باکتریایی، تهاجم بافتی و نکروز تسهیل می گردد. این سایتوتوکسیتی از طریق بازآرایی اکتین صورت می گیرد (۲۷).

۱-۳-۱۰-۱۰- سیستم ترشحی تیپ III

سیستم ترشحی تیپ III (TTSS) در میان یرسینیا، سالمونلا، شیگلا و گونه های سودوموناس به عنوان یک مکانیسم در تزریق مستقیم سموم به سلول های میزبان عمل می کند. سیستم ترشحی تیپ III سودوموناس آئروژینوزا متشکل از ۲۰-۳۰ پروتئین بوده و ساختار شبه پیلوسی داشته که امکان انتقال مستقیم سایتوتوکسین ها را از عرض

^{۱۵} *Corynebacterium diphtheriae*

غشاء باکتریایی به سیتوپلاسم یوکاریوت‌ها از طریق ساختار سوزن مانند با تشکیل سوراخ در غشاء یوکاریوت‌ها را می‌دهد. سه سایتوتوکسین ExoS, ExoT و ExoU به طور متغیر در استرین‌های مختلف بیان می‌شود و توسط سیستم ترشحی تیپ III سودوموناس آئروژینوزا به سلول‌های میزبان تزریق می‌شود. این سایتوتوکسین‌ها از ایمنی طبیعی میزبان جلوگیری می‌کنند (۱۳ و ۳۲).

۱-۳-۱۰-۱۱-آنزیم‌ها

سودوموناس آئروژینوزا آنزیم‌های مختلفی دارد که ممکن است نقش مهمی را در بیماری‌زایی این باکتری داشته باشند (۳۳). حداقل سه پروتئاز خارج سلولی کلیدی شامل: الاستاز، پروتئاز قلیایی و پروتئاز IV توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید می‌شود. بیشتر سویه‌های این باکتری مولد آنزیم‌های پروتئولیتیک بوده که قادرند بسیاری از پروتئین‌ها از جمله کازئین، الاستین و فیبرین را تجزیه کنند. پروتئازها در عفونت‌های سوختگی اهمیت بیشتری دارند، زیرا باعث آزاد شدن آمینو اسیدها و ترکیبات پپتیدی از بافت سوخته می‌شوند. هم چنین این پروتئازها فاکتور هاگمن انسانی (پرو آنزیم سرمی) را فعال و سبب التهاب بافتی می‌گردند (۳۴).

۱-۳-۱۰-۱۲-الاستاز

دو آنزیم به نام‌های Las A (سرین پروتئاز) و Las B (متالوپروتئاز حاوی روی) با هم فعالیت سینرژیسم^{۱۶} دارند موجب تجزیه الاستین شده و در نتیجه تخریب بافت پارانشیمال ریه و بروز ضایعات هموراژیک (اکتیمما گانگرتوزوم) می‌شوند. این آنزیم‌ها هم چنین موجب تخریب اجزای کمپلمان و جلوگیری از کارکرد و کموتاکسی نوتروفیل‌ها و در عفونت‌های حاد، موجب پیشرفت آسیب‌های بافتی می‌گردد. عفونت‌های مزمن سودوموناس آئروژینوزا با ساخته شدن آنتی‌بادی علیه Las A و Las B و رسوب کمپلکس‌های ایمنی در بافت‌های عفونی مشخص می‌شوند (۵).

^{۱۶} Synergism

۱-۳-۱۰-۱۳- آلکالین پروتئاز

مشابه الاستاز، آلکالین پروتئاز منجر به اختلال بافتی و انتشار سودوموناس آئروژینوزا می‌شود (۴). این پروتئین از طریق شکستن تعداد متنوعی از پروتئین‌های میزبان (اینترلوکین ۲ و چندین مولکول ادهزین دیگر) موجب سرکوب سیستم ایمنی و نکروز می‌شود (۳۵).

۱-۳-۱۰-۱۴- فسفولیپاز C

فسفولیپاز C یک همولیزین حساس به حرارت است با شکستن لیپیدها و لستین انهدام بافتی را تسهیل می‌کند. نقش این آنزیم در عفونت‌های تنفسی و ادراری نامشخص است با این حال ارتباط مهمی بین محصولات همولایزینی و بیماری شناسایی شده است (۱۱).

۱-۳-۱۰-۱۵- رامنولیپید

یک همولیزین مقاوم به حرارت است که باعث از بین رفتن لکتین موجود در سطح بافت‌های بدن می‌شود. این همولیزین منجر به مهار فعالیت مژه‌های دستگاه تنفسی می‌شود. سودوموناس آئروژینوزا دو نوع گلیکولیپید که مشابه مواد دترجنت هستند را با نام رامنولیپید تولید می‌کند. مونو رامنولیپید، رامنوزی است که به دایمر بتا- هیدروکسی دکانویک اسید متصل می‌شود و دی رامنولیپید یک دایمر رامنوز است که به دایمر بتا- هیدروکسی دکانویک اسید متصل می‌شود. رامنولیپید موجب ترشح موسین می‌شود و همچنین سبب از بین رفتن ماکروفاژهای مشتق شده در منوسیت‌ها، ممانعت از فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژها و موجب اختلال یون در سلول‌های اپی‌تلیال می‌شود (۳۴).

۱-۳-۱۱- یافته‌های بالینی

عفونت‌های ایجاد شده توسط سودوموناس آئروژینوزا کسب شده از محیط شیوع کمتری دارند و در ارتباط با محیط‌های مرطوب هستند (۳۵). عفونت‌های پوستی در ارتباط با آب‌های داغ در استخرهای شنا و حمام‌ها، نمونه‌ای از عفونت‌های کسب شده از محیط در ارتباط با این باکتری است (۳۶). افرادی که برای مدت طولانی و بدون وقفه از لنزهای تماسی استفاده می‌کنند به علت ظهور سودوموناس آئروژینوزا در محلول‌های شستشوی لنز در معرض خطر بالای ابتلا به کراتیت اولسراتیو هستند (۳۷). اوتیت خارجی گوش توسط این باکتری دارای شیوع

بالایی است (۳۸). پنجه‌های پای عفونی شده به علت استفاده از آنتی بیوتیک‌های موضعی و عفونت ناخن به علت تماس با آب، دترجنت‌ها و یا آزارهای مکانیکی از عفونت‌های شایع توسط این باکتری به شمار می‌رود که به خوبی شناسایی شده است. اندوفتالمیت ایجادشده توسط این باکتری بعد از عمل جراحی یا وارد شدن ضربه به چشم یک عفونت جدی به شمار می‌رود. اندوکاردیت معمولاً در معتادان تزریقی گزارش می‌شود (۳۹ و ۴۰).

عفونت بیمارستانی حاصل از سودوموناس آئروژینوزا معمولاً در رابطه با کسب این ارگانیسم از طریق سیستم های تهویه، درمان آنتی بیوتیکی و یا عمل جراحی است. این باکتری در تعداد کمی از انسان‌ها به صورت فلور نرمال پوست مشاهده می‌شود و به نظر می‌رسد که سودوموناس آئروژینوزا از طریق بیماران دارای این منبع باکتری به بخش مراقبت‌های ویژه وارد می‌شود (۴۱). بیماران دارای زخم‌های سوختگی شدید در معرض بیش‌ترین خطر برای ابتلا به این باکتری‌ها هستند اما امروزه در بیمارستان‌های سوختگی پیشرفته با استفاده از آنتی بیوتیک‌های قوی موضعی و برداشتن زخم‌های ناشی از سوختگی به نحو چشمگیری از میزان ابتلا به آن کاسته شده است (۴۲). بالای ۷ درصد از انسان‌ها در گلو، موکوس نازوفارنکس و یا روی پوست خود و در ۲۴ درصد افراد در مدفوع خود سودوموناس آئروژینوزا دارند (۴۳).

۱-۱۱-۳-۱- باکتری

پس از اشرشیا کولی^{۱۷} و استافیلوکوکوس اورئوس^{۱۸}، سودوموناس آئروژینوزا سومین (و گاه چهارمین) عامل ایجادکننده باکتری اکتسابی بیمارستانی می‌باشد. باکتری اغلب موارد در بیماران مبتلا به نوتروپنی، دیابت، سوختگی‌های وسیع و بدخیمی‌های هماتولوژیک رخ می‌دهد. بیشتر موارد باکتری سودوموناسی از عفونت دستگاه تنفسی تحتانی، دستگاه ادراری، پوست و بافت‌های نرم مخصوصاً زخم‌های سوختگی منشأ می‌گیرد. زخم‌های مشخص پوستی بنام اکتیماگانگروزوم در تعداد کمی از بیماران توسعه می‌یابد. بیمارانی که دچار باکتری ناشی از سودوموناس‌ها هستند از یک سپسیس تیپیک گرم منفی رنج می‌برند. بطور معمول این بیماران تب، افزایش ضربان

^{۱۷} *Escherichia coli*

^{۱۸} *Staphylococcus aureus*

قلب، به شدت نفس زدن، اشکال در تنفس، کاهش فشار خون و ازوتمی را بروز می‌دهند. ممکن است سپسیس منجر به شوک مهار نشدنی و انسداد کلیوی شود (۵).

۱-۳-۱۱-۲- عفونت استخوان و مفاصل

ممکن است که استخوان‌ها و مفاصل بیماران به وسیله سودوموناس آئروژینوزا از طریق انتشار خونی باکتری از جایگاه عفونت اولیه یا از طریق انتشار مستقیم عفونت از قسمت‌های مجاور آلوده شوند. افرادی که برای انتشار عفونت مستقیم در معرض خطر قرار دارند شامل بیماران با زخم‌های باز و بیماران با سلولیت هستند. گاهی درد در این مکان‌ها با تب و کاهش تحرک همراه می‌شود (۵).

۱-۳-۱۱-۳- عفونت سیستم عصبی مرکزی

سودوموناس آئروژینوزا موجب مننژیت و آبسه‌های مغزی در بیمارانی می‌شود که دارای نقص ایمنولوژیکی زمینه‌ای یا ضربه مغزی هستند. ممکن است که باکتری از طریق ضربه، انتشار خونی یا انتشار مستقیم از یک عفونت مزمن گوش یا سینوس به درون سیستم اعصاب مرکزی وارد شود. مننژیت ناشی از این باکتری اغلب در بیماران سرطانی رخ می‌دهد و معمولاً با تب، سردرد، خشکی گردن، گیجی و سایر علائم نورولوژیکی مننژیت همراه است (۵).

۱-۳-۱۱-۴- عفونت گوش

عفونت گوش خارجی به وفور توسط سودوموناس آئروژینوزا در شناگران (گوش شناگران) به عنوان یک ریسک فاکتور مهم روی می‌دهد. عفونت بدخیم گوش خارجی حالت شدید بیماری است که در افراد دیابتیک و افراد مسن دیده می‌شود. این عفونت می‌تواند بافت‌های زیرین را مورد تهاجم قرار داده و باعث آسیب اعصاب و استخوان جمجمه شود. تظاهرات تبییک شامل کانال گوش متورم و حساس بوده و با تخلیه چرک و گرانوله شدن

ابتدا و انتهای دیواره کانال همراه است. گاهی اوقات بیماران از تریسموس (گرفتگی) و کاهش شنوایی شکایت دارند و نیز ممکن است سپسیس رخ دهد. درجه مرگ و میری حدود ۲۰-۱۵٪ در بیماران درمان شده گزارش شده است. سودوموناس آئروژینوزا ممکن است عامل عفونت گوش میانی در نوزادان تازه متولد شده باشد. همچنین این باکتری شایع‌ترین عامل عفونت‌های مزمن چرکی گوش میانی در کودکان و بالغین است (۵).

۱-۳-۱۱-۵- عفونت چشم

عفونت‌های چشم در پی ترومای اولیه در قرنیه چشم رخ می‌دهند (خراشیدگی ناشی از زخم روی سطح چشم) و سپس نسبت به ورود سودوموناس آئروژینوزا از آب آلوده آسیب پذیر می‌شوند. زخم‌های قرنیه توسعه یافته و می‌توانند به سوی بیماری‌های وخیم‌تر چشمی پیش رود. لایه اپیدرم و استروما نکروز شده و در زخم، ترشحات چرکی جمع می‌شود. ممکن است چشم سرشار از چرک شود و عملکرد آن به سرعت از بین برود (۵).

۱-۳-۱۱-۶- عفونت دستگاه گوارش

عفونت‌های سودوموناسی دستگاه گوارش، در درجه اول در نوزادان تازه متولد شده و بیمارانی که دچار نقص سیستم ایمنی هستند رخ می‌دهد. بیماری در برخی از نوزادان تازه متولد شده به طرف انتروکولیت گسترش می‌یابد. بیماری در بیماران نوتروپنی که به انتروکولیت مبتلا هستند به طرف زخم‌های نکروتیک و خونریزی دهنده در لایه مخاطی روده توسعه می‌یابد (۵).

۱-۳-۱۱-۷- اندوکاردیت عفونی

اندوکاردیت سودوموناسی، غیر شایع است و به طور عمده در معتادین تزریقی مشاهده می‌شود. این افراد عفونت را در اثر استفاده از داروهای مخدر آلوده به ارگانیسم‌های منتقل شونده از طریق آب کسب می‌کنند (۵).

۱-۳-۱۱-۸- عفونت‌های دستگاه تنفسی

پنومونی اولیه بدون حضور باکتری می‌معمولاً هنگامی کسب می‌شود که مبتلایان به بیماری مزمن ریوی یا آسیب احتقانی قلب، از وسایل تنفس دهنده یا بخارساز آلوده برای دریافت مواد مخدر استفاده کنند. اما پنومونی

باکتری میک اولیه بیشتر در بیماران مبتلا به سرطان و نوتروپنی دیده می‌شود. در این بیماران ضایعات نکروتیک در ریه‌ها ایجاد می‌شود که مشابه ضایعات پوستی اکتیما گانگروزوم می‌باشد. عفونت‌های ریوی مزمن در بیماران مسن مبتلا به سیستمیک فیبروزیس روی می‌دهد (۵).

۱-۳-۱۱-۹- عفونت‌های پوست و بافت نرم

عفونت زخم‌های حاصل از سوختگی بیشترین مورد مشاهده شده محسوب می‌شود. کلونیزه شدن آئروژینوزا در زخم‌های سوختگی با آسیب عروق محلی، نکروز بافتی و باکتری می‌دنبال می‌شود و تا غلظت بیش از ۱۰ به توان ۵ باکتری به ازای هر گرم بافت رشد می‌کنند. بیمار بی‌قراری، تب یا کاهش درجه حرارت بدن، درد شکم همراه استفراغ و اسهال و لکوپنی را بروز می‌دهد. به محض اینکه عفونت نکروتیک تثبیت شد سودوموناس‌ها می‌توانند به سرعت در خون انتشار یابند و موجب سپسیس^{۱۹} برق‌آسا شوند. از عفونت‌های شایع دیگر که توسط سودوموناس در نتیجه شناور شدن آب‌های آلوده رخ می‌دهند، فولیکولیت می‌باشد. عفونت ثانویه سودوموناس آئروژینوزا در مبتلایان به آکنه و کسانی که موی پای خود را می‌کنند روی می‌دهد. همچنین سودوموناس آئروژینوزا در افرادی که دست‌هایشان تماس مداوم با آب دارد منجر به بروز عفونت‌های ناخن می‌شود. سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند باعث درمانیت وان گرم در افرادی باشد که از وان‌های آلوده شده به باکتری استفاده می‌کنند، همچنین این باکتری می‌تواند موجب بیماری پای گندیده حاره‌ای در بیمارانی شود که به بیماری قارچی پای ورزشکاران مبتلا هستند. سندرم ناخن سبز مشکی به علت التهاب اطراف ناخن است که توسط این باکتری ایجاد می‌شود. استفاده از کیسه‌های آب گرم عاملی برای افزایش عفونت‌های پوستی سودوموناس آئروژینوزا است (۵).

۱-۳-۱۱-۱۰- عفونت‌های دستگاه ادراری

سویه‌های اشریشیا کولی، انتروکوکوس^{۲۰} و سودوموناس آئروژینوزا عامل شایع عفونت‌های دستگاه ادراری بیمارستانی هستند. عفونت دستگاه ادراری بطور اولیه در بیمارانی که کاتترهای ادراری دارند دیده می‌شود. بطور

^{۱۹} Sepsis

^{۲۰} *Enterococcus spp*

معمول این بیماران تحت درمان چند آنتی‌بیوتیکی هستند که باعث گزینش گونه‌های سودوموناس مقاوم به آنتی‌بیوتیک می‌شود. پیلونفریت یک عارضه شایع عفونت‌های بالا رونده می‌باشد. شرایط زمینه‌ای میزبان که ممکن است به استفاده طولانی سوند ادراری نیاز داشته باشد از بهبودی عفونت‌ها ممانعت می‌کند (۵).

۱-۳-۱۲- تشخیص آزمایشگاهی

۱-۳-۱۲-۱- نمونه‌ها

با توجه به نوع عفونت، نمونه را باید از ضایعات پوستی، چرک، ادرار، خون، مایع نخاعی، خلط و مواد دیگر تهیه نمود (۱).

۱-۳-۱۲-۲- گستره‌ها

در گستره‌ها، اغلب باسیل‌های گرم منفی دیده می‌شود. خصوصیات ظاهری اختصاصی که با آن بتوان سودوموناس‌ها را از سایر باسیل‌های گرم منفی افتراق داد، وجود ندارد (۵).

۱-۳-۱۲-۳- کشت

این باکتری‌ها بر روی بیشتر محیط‌های عادی آزمایشگاه مانند نوترینت آگار، آگار خوندار، مک کانکی، مولر هینتون و تایوگلیولات رشد می‌کند. نمونه‌ها بر آگار خونی و محیط‌های کشت افتراقی که برای رشد باسیل‌های گرم منفی روده‌ای استفاده می‌شوند، قرار داده می‌شوند. سودوموناس‌ها در بیشتر این محیط‌ها، به خوبی رشد می‌کنند، اما ممکن است رشد آن‌ها از باکتری‌های روده‌ای، آهسته‌تر باشد. سودوموناس بر اساس مثبت بودن آزمون اکسیداز و داشتن متابولیسم تنفسی از بقیه ارگانیزم‌های روده‌ای متفاوت است (۴۴). این باکتری نسبت به ترکیبات دارای آمونیوم ۴ ظرفیتی مثل تترا دسیل متیل آمونیوم بروماید^{۲۱} (سیتیریماید) و بنزالکونیوم کلراید^{۲۲} مقاوم است. لذا از محیط سیتیریماید آگار برای تشخیص اختصاصی ایزوله‌های این باکتری استفاده می‌شود (۵). سودوموناس

^{۲۱} Tetra decyl methyl amonium bromide

^{۲۲} Benzalkonium chloride

آئروژینوزا لاکتوز را تخمیر نمی‌کند و به سهولت از باکتری‌های تخمیرکننده‌ی لاکتوز، افتراق داده می‌شود. کشت، آزمایش اختصاصی برای تشخیص عفونت این باکتری است (۶).

۱-۳-۱۲-۴- جداسازی سویه های سودوموناس آئروژینوزا

برای جداسازی این باکتری از سایر باکتری ها، از روش های بیوشیمیایی و سرولوژیکی استفاده می گردد. سودوموناس آئروژینوزا بین ۱۸ تا ۲۰ سروتایپ دارد که سروتایپ ها معمولاً بر اساس آنتی ژن اختصاصی O تعیین می گردد، البته در حدود ۷۰ درصد سویه های این باکتری در بیماران سیستمیک فیبروزیس به ویژه سویه های موکوئیدی غیر قابل سروتایپ کردن است (۴۵). امروزه از روش های مولکولی جهت شناسایی سودوموناس آئروژینوزا استفاده می شود. تست های بیوشیمیایی و سایر روش های تشخیصی فنوتیپی ممکن است باعث تشخیص نادرست این باکتری گردد که این امر در مورد بیماران سیستمیک فیبروزیس یک مانع جهت درمان دارویی و کنترل عفونت است. سکانس کردن منطقه حفاظت شده ۱۶sRNA به وسیله PCR، RFLP به عنوان یک استاندارد طلایی^{۲۳} در شناسایی گونه های سودوموناس در نمونه های محیطی و بالینی استفاده می شود (۴۶).

۱-۳-۱۲-۵- اهمیت روش های مولکولی

روش های مولکولی به دلیل دارا بودن سرعت بالا، جایگاه ویژه ای در تکنیک های تشخیصی نوین دارند کاربرد این روش ها در تشخیص بیماری های مختلف از اهمیت ویژه ای برخوردار بوده و در بعضی از مراکز آزمایشگاهی بعنوان روش های تشخیصی تکمیلی در کنار سایر آزمایش های روتین مورد استفاده قرار می گیرند (۴۷). روش های مرسوم تشخیص میکروبی صرفاً بر ویژگی های فنوتیپی ارگانیزم تکیه می کنند. اگر چه برخی از ویژگی های فنوتیپی مانند پروفایل ایزوآنزیم، حساسیت آنتی بیوتیکی و تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی اسیدهای چرب سلولی، دارای ویژگی کافی برای تشخیص سویه میکروبی هستند، اما با این وجود اغلب ویژگی های فنوتیپی مورد استفاده در آزمایشگاه میکروب شناسی، حساسیت کافی برای تشخیص سویه را ندارند (۴۷ و ۴۸). از زمانیکه روش هایی برای تجزیه و تحلیل ژنوم میکروبی در دسترس قرار گرفتند، فصل جدیدی در شناسایی خصوصیات میکروبی آغاز

^{۲۳} Gold Standard

گردید. با وجود اینکه اسید دزوکسی ریبونوکلیئیک در اواخر دهه ۱۸۶۰ کشف گردید، ولی تا شناسایی آنزیم‌های محدود الاثر و تکنیک‌های DNA نو ترکیب در دهه ۱۹۷۰ مورد استفاده قرار نگرفت. در طول این زمان، بسیاری از دانشمندان در حال تلاش برای کشف رمز و راز نهفته در DNA بودند. در طول چند سال گذشته، توسعه و استفاده از روش‌های تشخیصی مولکولی، انقلابی در تشخیص و کنترل بیماریهای عفونی ایجاد کرده است. سیستم‌های مبتنی بر PCR برای تشخیص عوامل بیماری به طور مستقیم از نمونه‌های بالینی و بدون نیاز به کشت، در تشخیص سریع میکروارگانیزم غیر قابل کشت و یا سخت رشد حائز اهمیت می‌باشند. علاوه بر این تجزیه و تحلیل تکثیر توالی DNA میکروبی، شناسایی و توصیف بهتر پاتوژن میسر می‌سازد. با توجه به پیشرفت‌های قابل توجه در روش‌های تشخیص مولکولی در سالیان اخیر و همچنین کاهش خطر آلودگی، کاهش هزینه‌ها، و سریعتر بودن این روش‌ها نسبت به روش‌های مرسوم، روش‌های مولکولی پتانسیل جایگزینی روش‌های تشخیصی مرسوم در میکروب شناسی را دارند. امروزه روش‌های مولکولی فصل جدیدی در میکروب شناسی باز نموده اند که تحت عنوان میکروب شناسی مولکولی به تشخیص عوامل بیماریزا، مکانیسم‌های بیماریزایی و غیره می‌پردازند (۴۷ و ۴۸).

۱-۳-۱۲-۶-روش‌های تایپینگ

از گذشته تاکنون، روش‌های تایپینگ یا تعیین گونه مختلفی جهت مطالعات اپیدمیولوژیکی باکتری‌ها ابداع و مورد استفاده قرار گرفته است. به طوری کلی این روش‌ها یا بر پایه ویژگی‌های فنوتیپی به عبارتی صفات قابل دیده شدن هستند، که فنوتیپینگ^{۲۴} نام دارند و یا بر اساس ویژگی‌های ژنوتیپی به عبارتی صفات غیر قابل دیدن هستند، که ژنوتیپینگ^{۲۵} نام دارند. امروزه، با توجه به ایجاد و گسترش روش‌های مولکولی جدید، بیشتر روش‌های تایپینگ بر اساس روش‌های مولکولی یا ژنوتیپینگ می‌باشند، البته نتایج حاصل از مطالعات اپیدمیولوژیک مولکولی باکتری‌ها، به روش تایپینگ و طرح مطالعه مورد نظر بستگی داشته و بنابراین انتخاب روش مناسب، در افزایش درک در مورد بیماری‌زایی، نحوه انتقال و روش‌های موثر جلوگیری از بیماری موثر می‌باشد (۴۹).

^{۲۴} Phenotyping

^{۲۵} Genotyping

در سیستم‌های سنتی تایپینگ، جهت متمایز نمودن باکتری‌ها، از روش‌های مبتنی بر فنوتیپ استفاده می‌شده است، برخی از این روش‌ها عبارتند از سروتایپینگ^{۲۶}، بیوتایپینگ^{۲۷} و آنتی‌بیوگرام، که در آن حساسیت به یک یا چند دارو سنجیده می‌شود. در برخی موارد این روش‌ها در توصیف اپیدمیولوژی بیماری‌های عفونی مفید بوده‌اند. معمولاً این روش‌ها دارای اشکالات اساسی مانند: تغییر زیاد در نتایج، کار آزمایشگاهی بسیار زیاد و کندی فرایند می‌باشند طوری که ارزش علمی و عملی آن‌ها در مطالعات اپیدمیولوژی با چالش جدی مواجه شده است. در پاسخ به این محدودیت‌ها، روش‌های مبتنی بر بیولوژی مولکولی ایجاد شده است تا به عنوان روش‌های تایپینگ اپیدمیولوژی در مطالعات باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و پروتوزوئرها استفاده گردند.

در این روش‌ها از بخش‌های ساختاری میکرو ارگانیسم برای طبقه‌بندی آن استفاده می‌شود. از جمله این روش‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

۱-۳-۱۲-۶-۱-۱- بیوتایپینگ

اساس این روش طبقه‌بندی باکتری‌ها بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک آنها می‌باشد که در واقع متداولترین روش تایپینگ در آزمایشگاه‌های کوچک است. ولی با توجه به استفاده زیاد از محیط‌های کشت و نیاز به مدت زمان طولانی برای حصول پاسخ، بیوتایپینگ روش مناسبی برای بررسی‌های اپیدمیولوژیک نبوده و باید با سایر روش‌ها به صورت همزمان مورد استفاده قرار گیرد.

۱-۳-۱۲-۶-۲- سروتایپینگ

روش سروتایپینگ یکی از معمول‌ترین روش‌هایی می‌باشد که برای تایپینگ سویه‌های سودومونای آئروژینوزا مورد استفاده قرار می‌گیرد. اساس این روش استفاده از دو ساختار مهم آنتی‌ژنیک این باکتری‌ها یعنی لیپولی ساکارید و کپسول پلی ساکاریدی می‌باشد. لیپولی ساکارید یا آنتی‌ژن O در ساختار LPS باکتری وجود داشته و بر اساس آن ۹ آنتی‌ژن O در این باکتری شناسایی شده است. با توجه به اینکه این آنتی‌ژن توسط کپسول پوشیده

^{۲۶} Serotyping

^{۲۷} Biotyping

شده و در نتیجه آن این آنتی ژن دور از دسترس سیستم ایمنی قرار می گیرد، طبقه بندی بر اساس این آنتی ژن مشکل خواهد بود (۵۰).

۱-۳-۱۲-۶-۳-۱-۳-۱ باکتریوسین تایپینگ

باکتریوسین ها، پروتئین های باکتریوسیدی هستند که توسط برخی از باکتری ها تولید شده که از رشد تعداد دیگری از باکتری ها از همان جنس و یا جنس دیگر جلوگیری می کنند. یک ایزوله باکتریایی می تواند از طریق توانایی اش در مهار یک سویه خاص و یا از لحاظ حساسیت به باکتریوسین هایی که توسط گروهی از سویه های تولید کننده باکتریوسین سنتز می شوند، شناسایی گردد. به علت ناپایداری باکتریوسین ها، تولید آنها در محیط مایع کم بوده و ماندگاری ضعیفی دارند. با این وجود از این روش با انجام اصلاحاتی برای تایپینگ کلبسیلا های محیطی و بالینی استفاده می شود (۵۱ و ۵۲).

۱-۳-۱۲-۶-۴-۱-۳-۱ آنتی بیوگرام

این روش تکنیک مناسبی است که می توان از آن برای بررسی حساسیت و مقاومت سویه ها نسبت به آنتی بیوتیک های رایج در درمان عفونت های باکتریایی استفاده نمود. ولی استفاده آن برای تایپینگ سویه ها، با توجه به اینکه ممکن است الگوهای حساسیت مشابهی در بین سویه ها وجود داشته باشد، دارای محدودیت می باشد. به طور کلی می توان بیان کرد که روش های فنوتیپی قدرت تمایز، تکرار پذیری و تیپ بندی به صورت کامل را ندارند.

۱-۳-۱۲-۶-۲-ژنوتیپینگ

ژنوتیپینگ به فرآیندی گفته می شود که به وسیله آن به بررسی ژنوتیپ افراد که همان خزانه ژنتیکی آنها است پرداخته می شود، به عبارتی در ژنوتیپینگ تفاوت ها و شباهت های توالی DNA در افراد یک جامعه که این جامعه می تواند انسانها، گیاهان، جانوران، میکروارگانیسم ها شامل: باکتریها، ویروسها و غیره باشند، مورد بررسی قرار می گیرد و با افراد همان جامعه یا جامعه دیگر به منظور رسیدن به مقاصد مختلف، مقایسه می گردد. یکی از کاربرد های ژنوتیپینگ در یافتن منابع آلوده کننده عفونت در بیمارستان ها به هنگام اپیدمی بیماری خاص، به منظور کنترل و جلوگیری از انتقال عفونت و عامل بیماریزا می باشد، که اپیدمیولوژی مولکولی نیز گفته می شود. ابزارهای مورد استفاده در ژنوتیپینگ همان روش های مولکولی می باشد. اگر به بررسی قسمت های خاصی از DNA

پرداخته شود روش های Mass-Sequencing Technologies نام دارد و اگر به بررسی کل توالی DNA پرداخته شود Whole Genome Sequencing نام می گیرد (۴۹).

برخی از روش های انگشت نگاری^{۲۸} ژنومی در حال حاضر به عنوان مناسب ترین روش ها برای ژنوتایپینگ میکروارگانیزم ها جهت اهداف اپیدمیولوژیکی در نظر گرفته می شوند. این روش ها شامل PFGE، ریبوتایپینگ^{۲۹}، و برخی از روش های تایپینگ مبتنی بر PCR مانند چندشکلی DNA با تکثیر تصادفی^{۳۰} یا RAPD، چند شکلی طول قطعه تکثیر یافته^{۳۱} یا AFLP، تکثیر عناصر (توالی های) تکرار شونده^{۳۲} و تعداد متغیر توالی های تکراری پشت سر هم^{۳۳} یا VNTR می باشند. تمامی این روش ها از میدان الکتریکی برای تفکیک قطعات DNA، مانند قطعات هضم شده با آنزیم های اندونوکلاز اختصاصی، قطعات DNA تکثیر شده و یا کل کروموزوم یا پلاسמיד، به الگوی منحصر به فرد یا انگشت نگاری هایی که توسط رنگ آمیزی DNA با اتیدیوم بروماید یا توسط دورگه سازی اسید نوکلئیک قابل مطالعه می شوند، استفاده می کنند (۵۳).

۱-۳-۱۲-۶-۲-۱- انواع روش های ژنوتایپینگ از نظر هدف آن

روش های ژنوتایپینگ را می توان در دو گروه روش های مقایسه ای و روش های کتابخانه ای قرار داد. روش های مقایسه ای در بیشتر موارد در بررسی های اپیدمیولوژی برای کمک به کنترل کوتاه مدت انتقال در بیمارستان یا جمعیت مورد نظر مورد استفاده اند. در این نوع بررسی هدف از ژنوتایپینگ مقایسه تعداد محدودی از سویه های جمع آوری شده طی یک دوره چند روزه تا چند ماهه برای شناسایی سویه های مرتبط کلونالی (اپیدمی) و سویه های نامرتب (پراکنده)^{۳۴} می باشد.

^{۲۸} Fingerprinting

^{۲۹} Ribotyping

^{۳۰} Random Amplified Polymorphic DNA

^{۳۱} Amplified Fragment Length Polymorphism

^{۳۲} Repetative elements PCR

^{۳۳} Variable number of tandem repeat

^{۳۴} Sporadic

روش های مناسب ژنوتایپینگ برای این کاربرد باید قابل تکرار بوده، دارای شاخص^{۳۵} بالای تفکیک پذیری (۰/۹۵) > و دارای قابلیت تایپ کنندگی کامل (ایجاد نتایج برای هر موجود) باشند. روش های مفید برای این هدف شامل: PFGE, ERIC-PCR, Rep-PCR, AP-PCR و تکثیر توالی های تکرار شونده بین ژنی^{۳۶} می باشند (۵۴). روش های ژنوتایپینگ کتابخانه ای بیشتر در بررسی های مربوط به بروز اپیدمیولوژی ها در آینده کاربرد دارند. در این نوع روش ژنوتایپینگ، داده ها جمع آوری شده و بعد از مدت زمان طولانی گاهی تا دهه ها بعد تحلیل می شوند بنابراین نیاز به استفاده از سویه های میکروبی استاندارد شده با قابلیت تکرار پذیری بالا را دارند. سیستم های تایپینگ کتابخانه ای برای ارزیابی بلند مدت استراتژی های جلوگیری و برای شناسایی و ردیابی عفونت های غیرمنتظره^{۳۷} استفاده می شوند. روش مورد استفاده باید دارای استاندارد بسیار بالایی بوده و همچنین، ایجاد یک روش پربازده، جهت ایجاد نتایج معنی دار^{۳۸}، ضروری است. روش های مناسب برای این هدف شامل RFLP، ریبوتایپینگ، انگشت نگاری توالی داخل توسط کاوشگر، تایپینگ PCR عناصر تکراری فاصله انداز (S rDNA ۱۶-۲۳ و عناصر بین-IS^{۳۹})، تکثیر انتخابی قطعات محدود شده ژنومی، تایپینگ بر اساس توالی آلی چند جایگاهی (PCR-RFLP، توالی یابی PCR) و الگوهای دورگه سازی الیگونوکلوئوتیدی با تراکم بالا (تراشه DNA) می باشند (۵۵).

۱-۳-۱۲-۶-۲-۲-۲-انواع روش های ژنوتایپینگ از نظر انجام کار

از نظر مکانیزم های انجام، روش های انگشت نگاری ژنتیکی به طور کلی به دو گروه تقسیم می شوند، روش های مبتنی بر معیارهای غیر مستقیم توالی های ژنتیکی مانند RAPD-PCR و PFGE و یا روش های مبتنی بر معیارهای مستقیم توالی های ژنتیکی مانند تایپینگ توالی چندگانه^{۴۰} یا MLST، توالی یابی کامل ژنوم باکتری، استفاده از تکنولوژی ریزآرایه^{۴۱}، و هیبریداسیون مقایسه ای^{۴۲} ژنوم.

^{۳۵} Index

^{۳۶} Interrepetitive element PCR typing

^{۳۷} Emerging

^{۳۸} Meaningful

^{۳۹} Inter-IS (insertion sequence) elements

^{۴۰} Multilocus Sequence Typing

^{۴۱} Microarray

^{۴۲} Comparative hybridization

البته برای بیشتر مطالعات اپیدمیولوژیکی دو عامل تعیین کننده هزینه و زمان، استفاده از روش‌هایی را که بر اساس توالی‌های مستقیم ژنومی می باشند محدود می‌سازد. برای مثال هزینه توالی یابی کامل ژنوم یک باکتری در سال ۲۰۰۵ حدود ۱۰۰ تا ۵۰۰ برابر هزینه هیبریداسیون مقایسه‌ای (۱۰۰۰ تا ۲۰۰۰ دلار در مقابل ۱۰۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ دلار) برای هر سویه بوده است و همچنین هزینه روش MLST (حدود ۱۴۰ دلار) به مراتب بسیار گران‌تر از روش PFGE (حدود ۲۰ دلار برای هر سویه) است. در روش‌های مرسوم مطالعات اپیدمیولوژیکی توالی یک یا چند منطقه ژنومی با هم مقایسه می‌شوند، برای مثال در MLST چند منطقه از ژنوم توالی یابی شده و با هم مقایسه می‌شوند. در برخی از روش‌ها که مبتنی بر استفاده از آنزیم‌های اندونوکلاز است با استفاده از آنزیم بخشی از ژنوم یا تمام آن به قطعاتی بریده می‌شود. برای مثال در PFGE تمام ژنوم با آنزیم‌های اندونوکلاز بریده شد و الگوی حاصله در سویه‌های مختلف مقایسه می‌شوند. تعداد و اندازه قطعات به دست آمده بستگی به تعداد جایگاه‌های برش آنزیمی دارد، بنابراین این روش اندازه‌گیری، روش اندازه‌گیری غیر مستقیم از توالی ژنوم است. در بین روش‌های مولکولی PFGE به عنوان روش مرجع^{۴۳} برای اکثر سویه‌های بیماری‌زای بیمارستانی، از جمله کلبسیلا پنومونیه در نظر گرفته می‌شود که این به علت توانایی افتراق بالا^{۴۴}، قابلیت تکرار پذیری^{۴۵}، تفسیر ساده و کاربرد عمومی^{۴۶} آن است.

۱-۳-۱۲-۶-۲-۳- توالی‌یابی کامل ژنوم

این روش دارای قدرت تفکیک کنندگی بالایی بوده و همچنین بسیار تکرار پذیر است. از نظر زمان انجام با روش‌های مرسوم فعلی ممکن است ماه‌ها به طول انجامد و هزینه آن نیز در حال حاضر بالاست. البته با پیشرفت‌های سریعی که در زمینه توالی‌یابی DNA حاصل شده کاهش چشمگیری در زمان و هزینه انجام این روش ایجاد شده است که ممکن است این روش را در آینده نه چندان دور به عنوان مناسب‌ترین و تنها روش با کارایی بسیار بالا معرفی نماید.

^{۴۳} Reference method

^{۴۴} Discriminatory ability

^{۴۵} Reproducibility

^{۴۶} Universal application

۱-۳-۱۲-۶-۲-۴- هدف قرار دادن توالی‌های تکراری ژنوم

در این روش‌ها توالی‌های خاصی از ژنوم توسط PCR، تکثیر شده و بررسی می‌شوند. به طوری کلی این روش‌ها شامل PCR انواع توالی‌های زیر می‌باشند:

۱. توالی‌های پالیندرومی خارج ژنی تکراری^{۴۷}

۲. توالی درون ژنی تکراری انتروباکتریایی^{۴۸}

۳. عنصر تکراری دوتایی^{۴۹}

۴. توالی‌های الحاق شونده^{۵۰}

۵. توالی‌های تکراری چندشکل و غنی از GC^{۵۱}

در مجموع این گروه از روش‌ها دارای قدرت تمایز دهنده و تکرار پذیری متوسطی می‌باشند (۵۳ و ۵۶).

۱-۳-۱۲-۶-۲-۵- توالی‌یابی مستقیم یک یا چند منطقه ژنتیکی

این روش‌ها دارای قدرت تفکیک متوسط به بالا هستند و از نظر تکرار پذیری توان بالایی دارند. در روش‌هایی که تنها یک منطقه ژنی توالی‌یابی شود، روش را روش متمرکز یا منطقه‌ای می‌نامند. زمان مورد نیاز برای انجام ۲ تا ۳ روز بوده و نیازمند تجهیزات خاص خود می‌باشد. روش تایپینگ MLST دارای قدرت تفکیک کنندگی متوسط به بالا بوده که این عامل توسط ژن‌های انتخاب شده تعیین می‌شود و از نظر تکرار پذیری و قابلیت تمایز دارای قدرت بالایی است. از آنجا که در این روش چند منطقه از ژنوم انتخاب می‌شود، این روش، روش منتشر می‌باشد. این تکنیک نیازمند تجهیزات خاص خود بوده و از نظر اجرایی نیازمند کار زیادی می‌باشد (۵۵ و ۵۶).

^{۴۷} Repetitive Extragenic Palindromic Sequences or REP

^{۴۸} Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus or ERIC

^{۴۹} Double Repetitive Element or DRE

^{۵۰} Insertional Sequences or IS

^{۵۱} Polymorphic GC-rich Repetitive Sequences or PGRS

اولین بار واکنش PCR توسط Mullis در سال ۱۹۸۴ توصیف شد. این واکنش بهترین روش، جهت تکثیر قطعه‌ای از DNA ژنوم به تعداد میلیون‌ها کپی در طی مدت زمان کوتاه می‌باشد. از این تکنیک در مهندسی ژنتیک، بیولوژی مولکولی، تشخیص سرطان‌های مختلف، تشخیص هویت، جرم شناسی، تعیین ترادف، باستان‌شناسی و غیره استفاده می‌شود (۵۷). واکنش PCR شامل سه مرحله می‌باشد که در طی آن ابتدا DNA دو رشته‌ای هدف واسرشته می‌شود^{۵۲}. سپس پرایمرها به مکمل خود روی DNA تک رشته‌ای اتصال می‌یابند^{۵۳}. آنگاه در طی یک واکنش آنزیمی پلیمریزاسیون توسط آنزیم Taq پلیمرز، رشته جدید بطور کامل سنتز می‌شود^{۵۴}. با تکرار این مراحل (۲۵-۴۰ سیکل) در نهایت میلیون‌ها کپی از سکانس DNA هدف سنتز می‌شود. هر یک از مراحل PCR در دمای ویژه‌ای انجام می‌شود. معمولاً مرحله Denaturation در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و مرحله Extension در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه برای فعالیت آنزیم Taq پلیمرز) انجام می‌شود. دمای مرحله اتصال پرایمرها به قطعه مکمل خود در DNA تک رشته‌ای، به سکانس آنها و دیگر شرایط واکنش بستگی دارد (۵۷).

پرایمرها قطعات کوتاهی از DNA به طول ۱۸-۳۰ نوکلئوتید هستند که مکمل بخش‌هایی از DNA هدف می‌باشند. پس از جدا شدن دو رشته DNA در حرارت بالا، پرایمرها با کاهش دما به سکانس‌های مکمل خود متصل می‌شوند. پرایمرها به عنوان جایگاه شناسایی آنزیم پلیمرز جهت همانندسازی هستند. آنزیم Taq پلیمرز نوکلئوتیدهای بعدی مکمل DNA هدف را با استفاده از داکسی ریبونوکلئوتیدها (dNTPs) می‌سازد و بدین ترتیب رشته DNA مکمل قطعه هدف سنتز می‌شود. اصول واکنش PCR در واقع از تکثیر DNA در داخل سلول زنده اقتباس شده است (۵۷).

^{۵۲} Denaturation

^{۵۳} Annealing

^{۵۴} Extension

۱-۳-۱۲-۶-۷-REP-PCR^{۵۵}

مجموعه ای از توالی های تکراری DNA در رونوشت های متعدد در ژنوم باکتریها پراکنده هستند. اگرچه عملکرد این توالی تکراری ناشناخته است ولی حضورشان برای انگشت نگاری DNA مفید است (۵۸) در REP-PCR، پرایمرهایی که مکمل توالی تکراری اند باعث قطعات DNA بین عناصر تکراری می شوند (۵۹ و ۶۰). سه خانواده از توالی های تکراری شامل توالی پالیندرومی تکراری خارج ژنی (۳۵-۴۰bp) (REP)، توالی داخلی ژنی تکراری انتروباکتریال (۱۲۴-۱۲۷ bp) (EREC) و توالی (۱۵۴BOXbp) در آزمایش REP-PCR استفاده می شوند (۵۸ و ۶۱). بهینه سازی شرایط الکتروفورز مانند ولتاژ به طور موثر امکان جداسازی قطعات DNA تکثیر یافته بیش از ۱۰۰۰ bp را افزایش می دهند. با توجه به هزینه پایین مواد، سرعت و تکنیک آسان، REP-PCR می تواند یک روش با ارزش برای تایپینگ سویه های باکتری باشد (۵۸). بر خلاف AP-PCR، این روش تکرارپذیری بیشتری دارد زیرا از پرایمرهای مخصوص جهت تکثیر استفاده می شود. نقص های این سیستم مشابه دیگر روش های PCR مانند آلودگی، آرتی فکت است و نیاز به کنترل های متعدد دارد (۵۸ و ۶۲).

۱-۳-۱۲-۷-آزمایش های ژنتیکی و سرولوژیک

PCR و واکنش آنتی بادی های اختصاصی با آنتی ژن های سطح باکتری از این دسته آزمایش ها می باشد.

۱-۳-۱۲-۸-سایر روش های تشخیصی

سودوموناس آئروژینوزا در دمای ۲۷ تا ۴۲ درجه سانتی گراد، به خوبی رشد می کند. رشد آن در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد، به افتراقش از سایر گونه های فلئوئورسنت سودوموناس، کمک می نماید (۵).

^{۵۵} Repetitive Extragenic Palindromic sequence-based PCR

۱-۳-۱- حساسیت نسبت به عوامل مختلف

۱-۳-۱- حساسیت نسبت به عوامل فیزیکی و شیمیایی

سودوموناس آئروژینوزا مقاومت خاصی در برابر گرما نداشته، در ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت از بین می رود، این باکتری ماهها در حرارت محیط قادر به ادامه حیات در آب می باشد اما در اثر خشک شدن پس از نیم ساعت ۹۹٪ باکتری ها می میرند. سودوموناس آئروژینوزا نسبت به بسیاری از مواد شیمیایی مقاومت نشان می دهد. این باکتری در بسیاری از محلول ها ی چشمی به راحتی یافت می شود. لذا توصیه شده است در این محلول ها از فیل اتانول همراه با یک محلول ضد عفونی کننده وسیع الطیف مانند بنزوالکونیم کلراید و یا کلروهگزیدین، کلروکروزول و برخی ترکیبات مرکب مؤثر نظیر EDTA - بنزوالکونیم و EDTA - کلروکروزول استفاده شود. گونه های این باکتری از مقاومت نسبی در برابر ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیوم، به خصوص ستریماید، دتول و بنزوالکونیوم کلراید برخوردار هستند به ویژه در محلول قلیایی ۲٪ گلو تار آلدئید، ماده ای موثر علیه این باکتری است. این ارگانسیم حساس به اسید و نمک های نقره است. از حساسیت نسبت به نقره جهت درمان عفونت های ناشی از سوختگی استفاده شده، با این حال سویه های مقاوم به نقره نیز گزارش شده است (۳۱).

۱-۳-۲- حساسیت در برابر آنتی بیوتیک

سودوموناس آئروژینوزا دارای یک مقاومت ذاتی نسبت به آنتی بیوتیک ها می باشد. آنتی بیوتیک ها با فعالیت بیش از ۷۵٪ علیه سودوموناس آئروژینوزا عبارتند از: کارباپنم ها، پی پراسیلین، سفپییم، سفنازیدیم، سیپروفلوکساسین، آمیکاسین و توبرامایسین. در بین کارباپنم ها مروپنم فعالیت بهتری نسبت به ایمی پنم علیه سودوموناس دارد. در مطالعه ای که اخیراً در آمریکا صورت گرفته بود ۱۶٪ از سویه ها به سه دارو یا بیشتر، از داروهای اصلی آمیکاسین، سفنازیدیم، سیپروفلوکساسین، جنتامایسین، ایمی پنم و پی پراسیلین مقاوم بودند و ۱٪ از گونه ها به هر ۶ دارو مقاوم بودند (۶۳). از این رو با هدف به تعویق انداختن بروز سریع مقاومت، دست یابی به اثرات هم افزایی

ضد میکروبی و درمان عفونت های شدید، استفاده همزمان از آنتی بیوتیک ها با توجه به پروتکل های مؤسسات درمانی صورت می گیرد (۶۴).

۱-۳-۱۳-۳- مقاومت دارویی چند گانه در سودوموناس آئروژینوزا

سویه های سودوموناس آئروژینوزا MDR به طور فزایندهای در سراسر جهان افزایش یافته است، اگر چه تعریف MDR متغیر است. اما اغلب شامل مقاومت به فلوروکینولون ها، سفالوسپورین های وسیع الطیف، کارباپنم ها و آمینوگلیکوزیدها می شود. به عنوان مثال افزایش پیش رونده ای در سویه های سودوموناس آئروژینوزا MDR، مقاومت به ۳ یا بیش از ۳ آنتی بیوتیک، از ۷/۱٪ در سال ۱۹۹۲ تا ۹/۹٪ در سال ۲۰۰۳ در آمریکا مشاهده شده است (۶۵و۶۶). سویه های سودوموناس آئروژینوزا MDR در برخی کشورها از جمله کشورهای آسیایی، آمریکای جنوبی، جنوب اروپا و کشورهایی که در مرز دریایی مدیترانه قرار گرفته اند، به تعداد زیاد یافت می شود. سویه های MDR از این جهت نگران کننده اند که با افزوده شدن مکانیزم های خاص مقاومت به دلیل کسب ساختارهای ژنتیکی مقاومت مانند ترانسپوزون، اینتگرون و پلاسمید، برگشتشان اگر غیر ممکن نباشد بسیار مشکل است (۶۷).

گزارش های اخیر مکانیزم های موفق مقاومت، مانند پمپ انتشار به خارج، فقدان نفوذ پذیری غشای خارجی و تولید آنزیم های مختلف را که بر اساس ایجاد MDR در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا می باشند، را روشن نموده اند. برای مثال به تازگی گزارش شده که پدید آمدن مکانیزم های مقاومت به بتالاکتام ها در اثر انتشار ESBL ها و متالوکارباپنمازها می باشد. تهدید مهم دیگر، انتشار کارباپنمازهای متعلق به گروه متالوبتالاکتامازها می باشد که انواع متعددی بوده (خانواده های IMP, VIM, SPM, GIM) و در تمامی کشور ها جدا شده اند از جمله این موارد در ژاپن، آسیا، آمریکای جنوبی، یونان، کانادا و ایتالیا پراکندگی زیادی دارند. اغلب ژن های متالوبتالاکتاماز همراه با ترانسپوزون ها، اینتگرون ها و یا پلاسمیدهایی می باشند که آن ها را ناقلین عالی برای یکی کردن ژن های مقاومتی که از نظر ساختاری با هم یکی نیستند می سازد (۶۵). ممکن است مشکل شناسایی سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده ESBL و متالوبتالاکتامازها در میکروبیولوژی بالینی منجر به افزایش انتشار

آن ها شود. بیان ESBL و متالوبتالاکتامها در ایزوله های منفرد نیز گزارش شده است (۶۶). بنابراین مقاومت دارویی تام در عفونت های سودوموناس آئروژینوزای کسب شده در ICU، در سراسر دنیا باید به طور فزاینده ای مشاهده شده باشد. اغلب تعیین کننده های مقاومت به بتالاکتامها با مقاومت به بیشتر آمینو گلیکوزیدها یکی است. اخیراً انتشار ژن های مقاومت آمینو گلیکوزیدهای جدید از ژاپن گزارش شده است (۶۸ و ۶۹). علاوه بر این آنزیم های تغییر دهنده آمینو گلیکوزیدی دو عملکردی نیز در این باکتری گزارش شده است (۷۰).

۱-۳-۱۴-آنتی بیوتیک ها

از زمان شناخته شدن موجوداتی تحت عنوان باکتری ها بشر همواره در چالش برای یافتن دارویی موثر بر عفونت های ناشی از آن بوده است. آنتی بیوتیک ها دسته ای از داروها هستند که برای از بین بردن عوامل ایجاد کننده ی بیماری های عفونی، به صورت گسترده در سراسر دنیا مصرف می شوند. آنتی بیوتیک ها باید دارای صفاتی باشد تا از آن جهت درمان بیماری های انسان استفاده کرد که باید شامل موارد زیر می باشد (۷۱).

- در بدن موجود زنده قدرت ضد میکروبی قوی داشته باشد.
- در بدن بیمار واکنش زیان بخش و نامطلوب ایجاد نکند.
- در خون، سرم فیزیولوژیک و مایعات بدن محلول باشد.
- ساختمانی نسبتاً پایدار و ثابت داشته باشد.

۱-۳-۱۴-۱-آنتی بیوتیک های غیر بتالاکتام

۱-۳-۱۴-۲-آنتی بیوتیک های بتالاکتام

بتالاکتامها داروهای مناسبی جهت درمان عفونت های باکتریایی هستند که در سراسر جهان مورد استفاده قرار می گیرند. خصوصیت مشترک تمام بتالاکتامها، داشتن حلقه مرکزی چهار ضلعی بتالاکتام و جلوگیری از تشکیل دیواره سلولی، به عنوان مکانیسم اولیه عملکرد است. وجود حلقه های اضافی یا جایگزین که به حلقه بتالاکتام اضافه

می‌شوند، شاخص قرار گرفتن داروی مربوطه در یکی از زیرگروه‌های پنی‌سیلین^{۵۶}، سفم^{۵۷}، کارباپنم^{۵۸} یا منوباکتام^{۵۹} است (۷۲).

مکانیسم اصلی مقاومت باسیل‌های گرم منفی به عوامل ضد میکروبی بتالاکتام، تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز است. بتالاکتامازها پروتئین‌های گلوبولاری هستند که دارای ۱۱ هلیکس آلفا و ۵ صفحه بتا می‌باشند و تاکنون ساختمان سه بعدی تعدادی از آن‌ها تعیین شده است. این آنزیم‌ها پیوند آمیدی حلقه بتالاکتام را شکسته و آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را برای باکتری بی اثر می‌کنند، در نتیجه درمان آنتی‌بیوتیکی را با شکست مواجه می‌کنند (۷۳).

همهٔ سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا یک بتالاکتاماز از نوع AmpC با واسطه کروموزوم تولید می‌کنند ولی تعداد نسبتاً زیادی بتالاکتاماز با واسطه پلاسمید تولید می‌کنند. آنزیم AmpC کروموزومی در حالت عادی سرکوب شده است ولی قویاً به وسیله سفالوسپورین‌های نسل اول القاء می‌شود. آن‌ها فاقد فعالیت ضد سودوموناس آئروژینوزا هستند. یوریدو پنی‌سیلین‌ها و سفالوسپورین‌های نسل سوم نیز در مقابل آنزیم AmpC ناپایدار هستند ولی سنتز آن را القاء نمی‌کنند. بنابراین آن‌ها تا وقتی که آنزیم القا نشده باشد فعال باقی می‌مانند ولی موتانت‌های سرکوب شده مثل آن‌هایی که AmpC را به مقدار زیاد می‌سازند به طور خودبخودی با فرکانس متوسط ایجاد می‌شوند (۷۴ و ۷۵) و می‌توان آن‌ها را به صورت *In vivo* در طی درمان سفالوسپورین و یوریدوپنی‌سیلین‌ها انتخاب کرد. این موتانت‌ها به همهٔ بتالاکتام‌ها به جز ایمپنم و گاهی اوقات کربنی سیلین و تموسی‌لین مقاوم هستند. انتخاب موتانت‌های سرکوب شده با سودوموناس آئروژینوزا به جز در وضعیت‌های مزمنی مثل عفونت تنفسی در بیماران سیستمیک فیبروزیس نادر است. تعداد زیادی بتالاکتامازهای با واسطه پلاسمید یا ترانسپوزون در سودوموناس آئروژینوزا گزارش شده است، ولی بروزشان کمتر از انتروباکتریاسه هاست.

در ۱۰ سال گذشته چندین گروه بتالاکتاماز با طیف اثر وسیع در باکتری کشف شده است. این آنزیم‌ها به گروه‌های A (پنی‌سیلینازها)، گروه B (متالوبتالاکتامازها) و یا گروه D (اگزاسیلینازها) تعلق دارند. تاکنون در این گونه باکتری چند آنزیم متعلق به گروه A شناسایی شده است که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از TEM-1، PER-1

^{۵۶} Penicillin

^{۵۷} Cephem

^{۵۸} Carbapenem

^{۵۹} Monobactam

۴۲ و SHV۲a. این آنزیم‌ها عامل مقاوم به یوریدو پنی‌سیلین، سفنازیدیم، سفپیروم و سفپیم هستند. تمام آنزیم‌ها در *In Vitro* به کلاولانیک اسید و سولباکتام حساس‌اند. ۱-PER برای نخستین بار از یک ایزوله سودوموناس آئروژینوزا عامل عفونت اداری یک بیمار ترک بستری در پاریس در سال ۱۹۹۲ شناسایی شد. در یک مطالعه مشخص شد که ۱۱ درصد سویه‌های جدا شده در ترکیه دارای این آنزیم بودند که البته هیچ یک از ایزوله‌ها پلاسمید نداشتند. در یک اپیدمی در سال ۱۹۹۹ در ایتالیا ۱۰۸ سویه سودوموناس آئروژینوزا دارای این آنزیم بودند.

گروه دوم بتالاکتامازها با طیف اثر وسیع موجود در سودوموناس آئروژینوزا ۱-IMP بوده و به گروه B آنزیم‌ها تعلق دارند. این آنزیم‌ها بیشتر بتالاکتام‌ها از جمله سفنازیدیم، سفپیم و سفپیروم (اما نه آزترونام) را هیدرولیز می‌کنند. از آنجاییکه این آنزیم‌ها، ایمی پنم و مروپنم را هیدرولیز می‌کنند. نام کارباپنماز را نیز برای آن دسته مناسب دانسته‌اند، مانند تمام آنزیم‌های گروه B، ۱-IMP. نیز به کلاولانیک اسید و سولباکتام مقاوم است. همچنین در ژاپن نیز ژن ۱-IMP که کدکننده کارباپنماز و عوامل مقاومت به ایمی پنم است شناسایی شده است همانند تمام آنزیم‌های گروه B، ۱-IMP نیز به کلاولانیک اسید و سولباکتام مقاوم است. ۱-IMP نخستین بار در سودوموناس آئروژینوزا به فرم وابسته به پلاسمید شناخته شد اما پس از مدتی شکل اپنتگرونی آن نیز کشف شد. این کشف می‌تواند دلیل شیوع آنزیم در برخی جنس‌های متعلق به انتروباکتریاسه را شرح دهد. به نظر می‌رسد ۱-IMP تنها محدود به ژاپن باشد.

گروه سوم بتالاکتامازهای با طیف اثر وسیع در این باکتری به گروه D تعلق دارند. این گروه بتالاکتاماز کمی به کلاولانیک اسید حساس‌اند (به غیر از OXA-۸). در این گروه از بین آنزیم‌های مشتق شده از OXA-۱۰ و OXA-۱۹ و OXA-۱۴ و OXA-۱۶ در باکتری وجود دارند. OXA-۱۸ دارای ویژگی شبیه به کلاس A در ESBL^{۶۰} هاست. این آنزیم سفنازیدیم و آزترونام را هیدرولیز کرده و کاملاً به اسید کلاولانیک حساس است. تمام این آنزیم‌ها به غیر از OXA-۱۸ پلاسمیدی‌اند. این آنزیم‌ها در سال ۱۹۹۲-۱۹۹۱ در ترکیه و تنها OXA-۱۸ در سال ۱۹۹۵ در فرانسه شناسایی شدند (۷۶).

^{۶۰} Extended spectrum Beta Lactamases

۱-۳-۱۴-۲-۱- پنی سیلین ها

پنی سیلین ها عمدتاً علیه باکتری های هوازی گرم مثبت و فاقد بتالاکتاماز، بعضی باکتری های گرم منفی هوازی و پرنیاز^{۶۱} و بعضی باکتری های بی هوازی فعال هستند. پنی سیلین ها از نظر ساختمان شیمیایی دارای یک هسته اصلی و مشترک به نام اسید ۶-آمینو پنی سیلانیک می باشند که از یک حلقه تیازولیدین متصل به یک حلقه بتالاکتام تشکیل شده است و از طرفی یک زنجیره جانبی (R-COOH) به کربن شماره ۶ حلقه بتالاکتام متصل است که در واقع پنی سیلین ها از لحاظ فارماکولوژی و آنتی باکتریالی وابسته به این زنجیره جانبی هستند. پنی سیلین ها مانع از فعالیت آنزیم های ترانس پپتیداز می شوند و از عمل ترانس پپتیداسیون دیواره سلولی ممانعت به عمل می آورند. در نتیجه دیواره سلولی ساخته نخواهد شد و یا اینکه دیواره نازکی به وجود می آیند که در برابر فشارهای داخلی باکتری حساس می گردد و در نتیجه غشای سیتوپلاسمی پاره شده و باکتری از بین می رود (۷۷).

۱-۳-۱۴-۲-۲- سفالوسپورین ها

سفالوسپورین ها دارای یک هسته آمینوسفالوسپورانیک اسید هستند که از یک حلقه بتالاکتام متصل به یک حلقه شش ضلعی دی هیدروتیازین تشکیل شده است. هسته آن که در هیدرولیز اسیدی ایجاد می شود تحت تاثیر تغییراتی قرار می گیرد که از آن جمله جانشینی در ریشه ۳ و ۷ است که فعالیت ضد میکروبی و خصوصیات آنرا تغییر می دهد. همچنین جانشینی یک گروه متوکسی در فعالیت ۷- حلقه بتالاکتام به تولید گروه جدید سفامایسین ها منجر می شود که این داروها دارای مقاومت بسیار بالایی به انواع بتالاکتامازها هستند. سفالوسپورین ها در برابر اغلب ارگانسیم های حساس به پنی سیلین موثر بوده و جانشین مفیدی در این موارد است. سفالوسپورین ها فعالیت ضد میکروبی خود را همانند پنی سیلین ها از طریق اختلال در عملکرد آنزیم های ترانس پپتیداز انجام داده و مانع سنتز دیواره سلولی در باکتری ها می شوند (۷۸ و ۷۹).

^{۶۱} Fastidious

۱-۳-۱۴-۲-۳- کارباپنم ها

کارباپنم ها از طریق صناعی از تینامایسین بدست می آورند. تینامایسین از باکتری استریتومایسس کالیتیه حاصل می شود. کارباپنم ها از یک حلقه بتالاکتام و یک حلقه غیر اشباع ۵ کربنی تشکیل شده است. دو آنتی بیوتیک مهم در این گروه ایمی پنم و مروپنم می باشد.

ایمی پنم یکی از وسیع الطیف ترین آنتی بیوتیک های بتالاکتام است، همواره همراه با سیلاستاتین تجویز می شود. طیف اثر مروپنم مشابه ایمی پنم می باشد و عوارض جانبی کمتری دارد. گونه های مختلف سودوموناس به سرعت به ایمی پنم مقاوم می شوند، بنابراین در این موارد باید به همراه یک آمینو گلیکوزید تجویز شود (۸۰ و ۸۱).

۱-۳-۱۴-۲-۴- منوباکتام ها

منوباکتام ها خانواده منحصر به فردی از بتالاکتام ها می باشند که دارای یک هسته منوسیکلیک (اسید ۳-آمینوباکتامیک) هستند. منوباکتام های طبیعی که توسط تعدادی از باکتری های خاک تولید می شوند فعالیت ضعیف ضد میکروبی دارند اما مطالعه بر روی فعالیت و ساختمانشان به توسعه منوباکتام های سنتتیک انجامیده که فعالیت ضد میکروبی بسیار بالا و پایداری را در برابر بتالاکتامازها نشان می دهند. با اصلاح ساختمان کلی این آنتی بیوتیک فعالیتش در برابر سودوموناس آئروژینوزا، هموفیلوس آنفولانزا و نیسریا بیشتر شده است. اولین داروی این گروه، آزترونام بود که طیف فعالیت آن مشابه آمینوگلیکوزیدها می باشد (۸۲).

۱-۳-۱۴-۳- بتالاکتامازها

مکانیسم اصلی مقاومت باسیل های گرم منفی به عوامل ضد میکروبی بتالاکتام، تولید آنزیم های بتالاکتاماز است. بتالاکتامازها پروتئین های گلوبولاری هستند که دارای ۱۱ هلیکس آلفا و ۵ صفحه بتا می باشند و تاکنون ساختمان سه بعدی تعدادی از آن تعیین شده است. این آنزیم ها پیوند آمیدی حلقه بتالاکتام را شکسته و آنتی بیوتیک های بتالاکتام را برای باکتری بی اثر می کنند، در نتیجه درمان آنتی بیوتیکی را با شکست مواجه می کنند (۸۳).

۱-۳-۱۴-۱- طبقه‌بندی بتالاکتامازها

با پیدایش آنزیم‌های بتالاکتاماز در میان باکتری‌ها پدیده مقاومت در بسیاری از آنها، بخصوص باکتری‌های ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی در حال افزایش است. در نتیجه درمان عفونت‌های ناشی از آنها را با مشکلات جدی روبرو ساخته است. بتالاکتامازها به دو صورت مولکولی (Ambler) و عملکردی (Bush- Jacoby- Medeiros) طبقه‌بندی می‌شوند. طبقه‌بندی مولکولی توسط Ambler در سال ۱۹۸۰، هنگامی که فقط سکانس چهار اسید آمینه از بتالاکتامازها شناسایی شده بود، صورت گرفت. بتالاکتامازها براساس ساختار اولیه به چهار کلاس مولکولی A تا D تقسیم می‌شوند.

کلاس A: باعث هیدرولیز پنی سیلین‌ها و سفالوسپورین‌ها می‌شود.

کلاس B: متالوبتالاکتامازهای وابسته به روی (zn) می‌باشد که قادر به هیدرولیز کارباپنم‌ها بوده و در باکتری‌هایی مانند سراسیا مارسسنس و سودوموناس آئروژینوزا گزارش شده‌اند. کلاس B بر اساس تفاوت آمینواسیدی که در جایگاه فعال این آنزیم‌ها وجود دارد به ۳ زیر کلاس B^۱، B^۲، B^۳ تقسیم می‌شود

کلاس C: که از آنها می‌توان به Ampc بتالاکتامازها اشاره نمود که توانایی هیدرولیز سفالوسپورین‌ها و سفومايسين‌ها را دارند .

کلاس D: بتالاکتامازهایی با قدرت هیدرولیز فراوان مثل OXA^{۶۲} بر علیه کلوکسازین ها واکساسیلین‌ها هستند. در طبقه‌بندی Bush، که در سال ۱۹۹۵ ارائه شد بتالاکتامازها براساس پروفایل سوبسترای و پروفایل مهارکنندگی به سه گروه و چندین زیر گروه تقسیم می‌شوند:

گروه ۱: سفالوسپورینازهایی هستند که توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مانند کلاولانیک اسید مهار نمی‌شوند.

گروه ۲: پنی سیلینازها یا سفالوسپورینازها یا هر دو را شامل می‌شود. توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مهار می‌شوند. بر اساس سوبسترای خود به ۸ زیرگروه ۲f، ۲e، ۲d، ۲c، ۲be، ۲br، ۲b، ۲a تقسیم می‌شوند.

^{۶۲} Oxacillinase

گروه ۳: شامل متالوبتالاکتامازهایی هستند که در سایت فعال آنها فلز روی وجود دارد که برای تخریب حلقه بتالاکتام مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم‌ها طیف سوبسترائی وسیعی دارند و قادر به هیدرولیز تمام بتالاکتام‌ها به جز منوباکتام (آزترئونام) هستند. این آنزیم‌ها داخل اینتگرون قرار گرفته و می‌توانند در پلاسمیدها یا کروموزوم ادغام شوند. لذا قابلیت انتقال به سایر سوبه‌های سودوموناس و باکتری‌های دیگر از جمله انتروباکتریاسه‌ها را دارند. متالوبتالاکتامازها توسط مهارکننده‌های بتالاکتامازی مهار نمی‌شوند. بلکه توسط شلاته‌کننده‌های فلزی از قبیل اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) و گروه تیول مهار می‌شوند (۸۴ و ۸۵).

۱-۳-۱۵- مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی به بروز یک ویژگی خاص در یک میکروارگانیسم گفته می‌شود که باعث می‌شود تحت تاثیر داروهای آنتی‌میکروبی قرار نگیرد. آن هم درحالی‌که قبلاً نسبت به داروی مذکور حساس بوده است و به این ترتیب آن دارو دیگر موجب مرگ یا توقف رشد آن میکروارگانیسم نخواهد شد. مصرف بی‌رویه یا نداشتن الگوی مصرف درست آنتی‌بیوتیکی یکی از چالش‌های اساسی در بروز مقاومت‌های باکتریایی تلقی می‌شود (۲۶). در بروز مقاومت دارویی فاکتورهای متنوعی دخیل است که شامل نوع باکتری عفونت‌زا، محل عفونت در داخل بدن، توزیع آنتی‌بیوتیک در بدن، غلظت دارو و وضعیت ایمنی بیمار می‌باشد. در تلاش انسان برای کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی بایستی به دو فاکتور مهم استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و سهولت در گسترش ژن‌های مقاومت دارویی توجه نمود. به طوری که روز به روز بر تعداد باکتری‌های مقاوم افزوده می‌شود و این امر موجب نگرانی میکروبیولوژیست‌ها، پزشکان و متخصصان صنایع دارویی شده است (۸۶).

۱-۳-۱۵-۱- چگونگی ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی

به طور کلی چهار مکانیسم عمده برای ایجاد مقاومت وجود دارد که عبارتند از (۸۷):

۱- نفوذپذیری پایین سل وال (مقاومت ذاتی)

۲- تولید بتالاکتامازها، آمینوگلیکوزیدازها و سفالوسپورینازهای خارج سلولی کروموزومی یا پلاسمیدی

۳- تغییر در جایگاه‌های پروتئینی اتصال به آنتی‌بیوتیک

۴- مکانیسم افلاکس فعال که آنتی‌بیوتیک را به خارج پمپ می‌کند.

اصلی‌ترین مکانیسم‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا کاهش تراکم درون سلولی از طریق افلاکس پمپ‌ها تولید بتالاکتامازهای خارج سلولی با منشاء پلاسمیدی و کروموزومی، آنزیم‌های تغییردهنده ساختمان شیمیایی آمینوگلیکوزیدها و کاهش نفوذپذیری غشاء باکتری در کانال‌های پورین ریز می‌باشد. دو مسیر عمده ی عبور آنتی‌بیوتیک‌ها از میان غشاء خارجی سودوموناس آئروژینوزا، انتقال یون‌های منیزیم موجود در پل‌های عرضی لیپولی ساکارید باکتری و تخریب آن و مسیر دوم عبور از میان پورین‌های غیراختصاصی می‌باشد به گونه‌ای که تشکیل کانال‌های پر از آبی را در غشاء می‌دهد و به صورت یک غربال مولکولی از عبور مولکول‌های بزرگ‌تر از ۹ کیلودالتون جلوگیری می‌کند (۸۸ و ۸۹ و ۹۰).

۱-۳-۱۶-منشاء مقاومت دارویی

۱-۳-۱۶-۱-منشاء ژنتیکی

۱-۳-۱۶-۲-مقاومت کروموزومی

این مقاومت در نتیجه‌ی جهش خود به خودی در ژن‌های کنترل‌کننده‌ی باکتری به داروهای ضد میکروبی رخ می‌دهد. جهش‌های کروموزومی بیش از همه بر اثر تغییر در ساختمان گیرنده‌ی یک دارو مقاوم می‌شوند. ناحیه‌ی کوچکی از کروموزوم باکتری ژن‌های ساختمانی اغلب گیرنده‌های دارویی از جمله آمینوگلیکوزیدها را کد می‌کند. گاهی بر اثر جهش، PBP ها از بین می‌رود و یا تغییر شکل می‌دهد به طوری که داروهای بتالاکتام قادر به اتصال نیستند، در نتیجه جهش‌های مقاوم نسبت به داروهای بتالاکتام به وجود می‌آید. در جهش خود به خودی، افلاکس پمپ‌ها آنتی‌بیوتیک‌ها را دفع می‌کند. کلنی باکتری‌ها با آنتی‌بیوتیک تخریب می‌شود و باکتری‌های باقی‌مانده جهش یافته و امکان مقاومت دارویی وجود دارد؛ باکتری‌های مقاوم، کلنی‌های مقاوم چندگانه ایجاد می‌کنند. جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های توپوایزومراز و جهش‌های تنظیمی که قادر به افزایش بیان ژن‌های ذاتی و اپرون‌ها هستند در برخی شرایط منجر به مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شوند (۹۱ و ۹۲).

۱-۳-۱۶-۳- مقاومت خارج کروموزومی

مقاومت کسب شده با مبادله‌ی ژن‌ها بین سویه‌های باکتریایی از طریق جابه‌جایی قطعات DNA به عنوان پلاسمیدها حاصل می‌شود. این پلاسمیدها اطلاعات را از سلولی به سلول دیگر انتقال می‌دهند. عوامل R دسته‌ای از پلاسمیدها هستند که ژن‌های مقاومت به یک و گاهی چند داروی ضد میکروبی را حمل می‌کنند. ژن‌های پلاسمیدی مربوط به مقاومت دارو معمولاً تولید آنزیم‌هایی که سبب از بین بردن اثر داروهای ضد میکروبی می‌شوند را کنترل می‌کنند. مقاومت چند دارویی در سودوموناس آئروژینوزا به وسیله‌ی رخدادهای ژنتیکی متعددی از جمله کسب جهش‌های گوناگون و انتقال افقی ژن‌های مقاوم آنتی‌بیوتیکی ایجاد می‌شود (۹۲).

۱-۳-۱۶-۴- منشاء غیرژنتیکی

فعالیت اغلب داروهای ضد میکروبی به تکثیر فعال باکتری‌ها نیاز دارد. پس میکروارگانیسم‌هایی که به صورت متابولیک غیر فعال هستند یعنی تکثیر نمی‌یابند ممکن است به صورت فنوتیپی به داروها مقاوم گردند، با این حال نسل‌های بعدی کاملاً حساس می‌باشند. یا اینکه میکروارگانیسم ممکن است در محل‌هایی از بدن ایجاد عفونت کنند که دارو نتواند در آنجا وارد شود. اغلب مکانیسم‌هایی که قبلاً برای ایجاد مقاومت بیان شد مثل کاهش غلظت داخل سلولی دارو، کاهش جذب دارو از طریق غشا سلولی و می‌تواند از موارد غیر ژنتیکی مقاومت باشد (۶۸).

۱-۳-۱۷- روش دیسک دیفیوژن آگار:

تست غربالگری دیسک دیفیوژن باید بر روی محیط مولر هینتون آگار که توسط سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت نیم مک فارلند تلقیح شده است، صورت گیرد و پس از ۱۶ الی ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی گراد، قرائت شود. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی مورد نیاز و همچنین قطر هاله عدم رشد ارگانیسم‌ها در برابر هر یک از دیسک‌ها طبق استانداردهای CLSI صورت می‌گیرد. متعاقب این روش تست دیسک ترکیبی^{۶۳} انجام می‌گیرد (۹۳).

^{۶۳} Combined Disk

۱-۳-۱۷-۱- تست های تاییدی:

تست غربالگری ESBLs: ابتدا تمامی ایزوله ها بر طبق دستورالعمل استاندارد با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن نسبت به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم، سفوتاکسیم، آزترونام، سفیدوکسیم و سفتریاکسون مورد غربالگری قرار می گیرند.

تست تاییدی ESBLs: ایزوله هایی دارای کاهش حساسیت نسبت به هر کدام از آنتی بیوتیک های مرحله غربالگری توسط تست تائیدی تولید ESBLs به روش دیسک ترکیبی مورد بررسی قرار می گیرند. در این آزمون از دیسکهای سفنازیدیم و سفنازیدیم / کلاولانیک اسید، سفوتاکسیم و سفوتاکسیم / کلاولانیک اسید استفاده می شود. نتایج طبق دستورالعمل CLSI تفسیر می گردد بدین صورت که افزایش قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی معادل $5 \text{ mm} \geq$ در مقایسه با قطر هاله عدم رشد دیسک به تنهایی باشد از نظر ESBLs مثبت در نظر می گیریم. در آزمون های فنوتیپی از *E.coli* ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان کنترل منفی و از *E.coli* ATCC ۳۵۲۱۸ و *Klebsiella pneumonia* ATCC ۷۰۰۶۰۳ به عنوان کنترل مثبت استفاده می شود (۹۴).

۱-۳-۱۸- سایر آنتی بیوتیک ها

تقریباً همه سویه های سودوموناس آئروژینوزا آنزیم های تغییردهنده آمینوگلیکوزیدها را بیان می کنند ولی انواع با واسطه پلاسمید نسبتاً کمیاب است. آنزیم ها با استیلایسون، فسفریلاسیون یا آدنیلایسون آمینوگلیکوزیدها را تغییر می دهند. نهایتاً همه سویه ها دارای ۶ فسفوترانسفراز و ۳ فسفوترانسفراز هستند که نتومایسین و کانامایسین را تغییر می دهند. ۳ استیل ترانسفراز و ۲ آدنیل ترانسفراز هر دو جنتامایسین و توبرامایسین را تغییر می دهند و ۶- استیل ترانسفراز باعث مقاومت به آمیکاسین می گردد (۱). پیشنهاد شده که تمایل غشاء خارجی به جنتامایسین در سویه های سودوموناس آئروژینوزا دارای لیپو پلی ساکارید B-band نسبت به A-band بالاتر است. سویه های دارای لیپو پلی ساکارید B-band به کشتن ناشی از آنتی بیوتیک ها حساس ترند. سویه های دارای هر دو شکل LPS بیشتر از سویه های فاقد یکی از دو شکل به جنتامایسین متصل می شوند. این نتایج نشان می دهد که اتصال

یونی آمینوگلیکوزیدها به غشای خارجی سطوح سلول سودوموناس آئروژینوزا نه تنها سطح را ضعیف می‌کند بلکه در مرگ سلولی اهمیت دارد. کینولون‌های فلورینه به ویژه سیپروفلوکساسین به شدت علیه سودوموناس فعال‌اند. با این وجود مقاومت می‌تواند در طی درمان طولانی مدت عفونت‌های مزمن ایجاد شود. همانند دیگر باکتری‌ها هنگامی که دارو قطع شود سویه‌ها به شدت دوباره حساس می‌شوند. مقاومت سطح بالا اغلب ناشی از موتاسیون در DNA ژیراز است ولی مقاومت در سطح پایین می‌تواند نتیجه نفوذناپذیری و یا تنظیم افزایشی سیستم افلاکس چند دارویی باشد. کینولون‌ها می‌توانند به وسیله پورین‌ها یا به وسیله یک مسیر جذب خود راه اندازی شده شبیه آمینوگلیکوزیدها از غشای خارجی عبور کنند. تغییرات در پروتئین‌های اصلی غشاء خارجی (MOMP) و LPS هر دو در کاهش نفوذ سیپروفلوکساسین در سودوموناس آئروژینوزا ثابت شده است (۹۵).

۱-۳-۱۹- اپیدمیولوژی

سودوموناس آئروژینوزا ارگانیسمی است که در همه جا انتشار دارد و در آب، خاک و گیاهان یافت می‌شود. این ارگانیسم بر روی پوست و در دستگاه گوارشی و حلق حدود ۳ درصد از مردم، به صورت فلور نرمال وجود دارد. اما میزان حامل بودن آن، در میان پرسنل بیمارستان ممکن است به ۲۰ درصد برسد (۱). سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند دما را تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد تحمل کند. این باکتری می‌تواند در بیشتر محیط‌ها با کمترین میزان مواد غذایی رشد کند و حتی در آب مقطر، با مصرف CO_2 حل شده در آب و باقی مانده‌های سولفور و فسفر و آهن زنده می‌ماند (۵). از آنجاییکه سودوموناس‌ها در محیط‌های مرطوب به خوبی رشد می‌کنند، بیشتر عفونت‌های ناشی از این باکتری به علت قرار گرفتن در معرض رطوبت است. مانند عفونت‌های پوستی این باکتری که از حمام‌ها و استخرهای شنا انتقال می‌یابد و عفونت‌های چشمی که در اثر تماس با لنزهای مرطوب است (۵). از این رو باید به ظرف‌شویی‌ها، گل‌ها، حمام‌ها، دوش‌ها، لوله‌های آب گرم و سایر محیط‌های مرطوب توجه مخصوص نمود. این باکتری، بیشتر عامل عفونت‌های بیمارستانی است و کنترل عفونت‌های آن شبیه سایر عوامل عفونت‌های بیمارستانی است (۱). عفونت‌های بیمارستانی و کلونیزاسیون باکتری در بخش‌های مختلف کلینیکی معمولاً در موارد زیر مشاهده می‌شود:

۱- افرادی که از دستگاه‌های تهویه مکانیکی استفاده می‌کنند.

۲- افرادی که تحت درمان وسیع آنتی بیوتیکی هستند.

۳- افراد تحت درمان با داروهای شیمی درمانی

۴- افرادی که سابقه جراحی داشتند (۵).

۱-۳-۲۰-درمان عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا

درمان عفونت‌های ایجادشده توسط سودوموناس آئروژینوزا یک مشکل پیچیده برای پزشکان به شمار می‌رود. نه تنها این باکتری‌ها به صورت ذاتی به دامنه وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم‌اند بلکه توانایی افزایش مقاومت را هنگام درمان کسب می‌کنند. این توسعه مقاومت در هنگام درمان آنتی‌بیوتیکی مخصوصاً در بیماری سیستمیک فیبروزیس (به عنوان یک بیماری مزمن) به علت دوره مصرف آنتی‌بیوتیک به مدت طولانی، مشکل‌ساز است. اخیراً نشان داده شده است که بسیاری از ایزوله‌های جدا شده از بیماران سیستمیک فیبروزیس دارای توانایی فوق‌العاده‌ای برای کسب مقاومت آنتی‌بیوتیکی در طی دوره درمان دارند (۹۶). به رغم چنین مقاومت گسترده‌ای برای درمان عفونت‌های این باکتری تعدادی آنتی‌بیوتیک موثر وجود دارد. مهم‌ترین خانواده‌های آنتی‌بیوتیک که در درمان سودوموناس آئروژینوزا موفقیت کسب کرده‌اند شامل آمینوگلیکوزیدها (از قبیل جنتامایسین و توبرامایسین)، پنی‌سیلین‌های نیمه سنتتیک (مثل کاربنی‌سیلین، تیکارسیلین و پیراسیلین)، سفالوسپورین‌های نسل سوم (سفنازیدیم و سفوپروزان)، کینولون‌ها (مانند سیپروفلوکساسین) و کارباپنم‌ها (شامل ایم‌پنم، مروپنم) هستند. علاوه بر لیست بالا اخیراً در عفونت‌های سودوموناس با مقاومت فراوان از پلی میکسین استفاده می‌شود. این دارو به دلیل عوارض جانبی در موارد محدودی استفاده می‌شود (۱۰).

یکی از راهبردهای درمان عفونت‌های وخیم در سودوموناس آئروژینوزا استفاده از درمان ترکیبی است. ترکیب یک پنی‌سیلین نیمه سنتتیک مثل تیکارسیلین یا پیراسیلین (با یا بدون متوقف کننده‌های بتالاکتاماز) و یک آمینوگلیکوزید مثل توبرامایسین در محیط *In vitro* فعالیت ضد باکتری موثری را بر ضد سودوموناس آئروژینوزا

نشان می‌دهد. همچنین در درمان عفونت‌هایی مثل CF از یکی از داروهای کینولون‌ها، بتالاکتام‌های جدید همانند سفپروزان یا سفتازیدیم، کارباپنم‌ها (ایمی پنم و مروپنم) به همراه یک آمینوگلیکوزید استفاده می‌شود (۹۷).

یک استراتژی دیگر برای افزایش تأثیر داروهای ضد سودوموناسی در عفونت‌های تنفسی همچون CF، استنشاق آنتی بیوتیک‌هایی مثل کاربنی سیلین، جنتامایسین، سفالوسپورین، توبرامایسین، کلی ستین، پلی میکسین B و آمیکاسین است (۹۸و۲).

فصل دوم

اهداف و فرضیات

۲-۱- هدف اصلی

تعیین فراوانی بتالاکتامازهای با طیف گسترده تیپ های OXA، GES-۱ و VEB-۱ و تیپ بندی مولکولی آنها به روش REP-PCR در سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیمارستان های شهرهای قزوین و تهران

۲-۲- اهداف فرعی

- تعیین فراوانی گونه های سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به روش مولکولی
- غربالگری ایزوله های مقاوم [حساسیت کاهش یافته سودوموناس آئروژینوزای به روش دیسک آگار دیفیوژن (DAD) با متد استاندارد Kirby-Bauer]
- تعیین فراوانی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به روش فنوتیپی Combined Disc Method
- تعیین توزیع فراوانی مجموعه ژن های *bla_{OXA}*، *bla_{GES-۱}* و *bla_{VEB-۱}* در سودوموناس آئروژینوزای تولیدکننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف به روش PCR

۲-۳- اهداف کاربردی

این مطالعه ضمن شناسایی الگوهای مختلف مقاومت دارویی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای جمع آوری شده از بیمارستان های منتخب به انتخاب و پیشنهاد آنتی بیوتیک های مناسب و مؤثر در راستای کاهش درمان نامناسب آنتی بیوتیکی (که کاهش بار مالی تحمیلی را به همراه دارد) می پردازد. در ادامه شناسایی مکانیسم

های عمده دخیل در بروز مقاومت دارویی اعم از نوع ذاتی و اکتسابی می تواند ضمن نیل به اهداف اپیدمیولوژیک در فرایند طراحی داروهای مؤثر درمانی مورد استفاده قرار بگیرد.

۲-۴- سوال های پژوهش

- آیا گونه های سودوموناس آئروژینوزای تولید کننده بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBLs) از فراوانی بالایی برخوردارند؟
- آیا ژن های ESBLs تیپ bla_{OXA} در ایجاد مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های به کار رفته از آمار بالایی برخوردار است؟
- آیا ژن های ESBLs تیپ bla_{GES-1} در ایجاد مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های به کار رفته دخیل است؟
- آیا ژن های ESBLs تیپ bla_{VEB-1} در ایجاد مقاومت دارویی نسبت به آنتی بیوتیک های به کار رفته دخیل است؟
- توزیع ژنهای bla_{OXA} ، bla_{GES-1} و bla_{VEB-1} کد کننده ESBLs در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای جمع آوری شده چگونه است؟

فصل سوم

بررسی متون

- طی مطالعاتی که صادقی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ۱۰۸ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از بیمارستان‌های مختلف شهر اراک انجام دادند، ۴۰ ایزوله مقاوم به ایمی‌پنم بودند. درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمیکاسین، ایمی‌پنم، جنتامایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب برابر با ۱۱/۱٪، ۳۷٪، ۱۵/۷٪، ۲۹/۶٪ و ۱۷/۶٪ گزارش شد (۹۹).

- در مطالعه دیگری که توسط ایمانی فولادی سال ۲۰۱۱ در زنجان بر روی ۱۱۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های مختلف بالینی انجام گرفت درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی سیلین، آمیکاسین، تتراسیکلین، سفوتاکسیم، جنتامایسین، سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم به ترتیب برابر با ۹۲/۷٪، ۱۷/۳٪، ۸۶/۴٪، ۴۳/۶٪، ۲۵/۵٪، ۲۰/۹٪، ۲۰/۹٪ گزارش شد (۱۰۰).

- در مطالعه‌ای که صادقی و همکاران سال ۲۰۱۰ بر روی ۱۰۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا انجام دادند، درصد مقاومت آنتی‌بیوتیکی نسبت به آمیکاسین، جنتامایسین، سفتازیدیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب برابر با ۷۳٪، ۷۳٪، ۸۶٪ و ۵۵٪ گزارش شد (۱۰۱).

- Shaikh و همکاران در سال ۲۰۱۴ در هند با مطالعه بر روی ۱۸۷ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا نشان دادند که ۴۷ ایزوله (۲۵/۱۳٪) دارای فنوتیپ ESBLs مثبت هستند. بیشتر ایزوله‌های جدا شده از نمونه خلط بودند (۱۰۲).

- در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ توسط فرشاد زاده و همکاران در اهواز انجام پذیرفت تعداد ۱۸۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از ایزوله‌های زخم و بیماران سوختگی جدا گردید. که از این تعداد ۹۶ ایزوله

(۵۱/۹٪) دارای فنوتیپ ESBLs مثبت بودند و میزان مقاومت آنها به دیسک های سفتریاکسون (۹۱/۶٪) و به آزترونام (۹۷/۵۷٪) گزارش گردید (۱۰۳).

- در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۳ در مصر و توسط EL-baky و همکاران انجام شد از ۵۸ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا ۴۲ ایزوله (۷۲/۴٪) تولید کننده بتالاکتام بودند و ۱۶ ایزوله (۲۷/۵٪)، ایزوله های ESBLs مثبت بودند (۱۰۴).

- وحدانی و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی ۲۲۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران بستری بیمارستان مطهری تهران مشخص ساختند (۱۸٪) این باکتریها دارای الگوی فنوتیپی ESBLs مثبت هستند (۱۰۵).

- در مطالعه ای که در سالهای ۲۰۰۹ توسط Ullah و همکارانش در پاکستان صورت پذیرفت از میان ۱۰۶ ایزوله سودوموناس که از بیماران بخش سوختگی جدا شده بود ۳۸ (۳۵/۸۵٪) از این نمونه ها دارای الگوی فنوتیپی ESBLs مثبت رانشان دادند (۱۰۶).

- در مطالعه ای که توسط Jiang و همکارانش در سال ۲۰۰۶ بر روی ۷۵ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا انجام شد، ۳۶ ایزوله الگوی مقاومت چند دارویی را نشان دادند که از این تعداد ۳۴ ایزوله از نظر حضور بتالاکتام های وسیع الطیف (ESBLs) مثبت بودند (۱۰۷).

- در مطالعه ای که توسط فرشاد زاده و همکاران در سال ۲۰۱۴ در مرکز سوختگی در اهواز انجام شد، گزارش داد که (۵۴/۱۶٪)، (۶۸/۷۵٪) و (۱/۰۴٪) از نمونه های مولد ESBL از سودوموناس ژن bla_{CTX-M} ، bla_{OXA-10} ، bla_{PER-1} بودند (۱۰۳).

- در مطالعه ای که توسط Mirsalehian و همکاران در سال ۲۰۱۰ در ایران بر روی ۱۷۰ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای جمع آوری شده از بیمارستان مطهری تهران انجام شد نشان دادند که ۱۴۸ ایزوله (۸۷/۰۵٪) الگوی مقاومت دارویی چندگانه را نشان دادند که ۶۷ ایزوله (۳۹/۴۱٪) تولید کننده ESBLs بودند. در میان ایزوله های تولید کننده ESBLs، ۵۰ ایزوله (۷۴/۶۲٪) تولید کننده *bla*_{OXA} و ۲۱ ایزوله (۳۱/۳۴٪) تولید کننده *bla*_{VEB-۱} بودند (۱۰۸).

- در مطالعه ای که توسط Alipour و همکاران در سال ۲۰۱۰ در دو مرکز در ایران انجام شد در مرکز اول در ایلام از مجموع ۳۵۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا، ۱۰۵ نمونه (۳۰٪) از نظر حضور ESBLs مثبت بودند که از این میان به ترتیب ۹۲ ایزوله (۸۷/۶۱٪) و ۵ ایزوله (۴/۷۶٪) به ترتیب از نظر حضور ژن های *bla*_{OXA-۱۰} و *bla*_{OXA-۲} مثبت بودند. در مرکز دوم در کرمان از مجموع ۱۲۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا ۴۶ ایزوله (معادل ۳۸/۳۳٪) از نظر حضور ESBLs مثبت بودند که به ترتیب ۲۹ ایزوله (۶۳٪) و یک ایزوله (۲/۱٪) از نظر حضور ژن های *bla*_{OXA-۱۰} و *bla*_{OXA-۲} مثبت بودند (۱۰۹).

- در مطالعه ای که توسط Shahcheraghi و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی ۴۱ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا تولید کننده ESBLs در کرمان انجام شد مشخص گردید که تمام ایزوله ها (۱۰۰٪) دارای ژن *bla*_{VEB-۱}، (۲۴/۴٪) دارای ژن *bla*_{GES-۱}، ۲۹ ایزوله (۷۰/۷٪) دارای ژن *bla*_{OXA-۱}، ۷ ایزوله (۱۷/۱٪) دارای ژن *bla*_{OXA-۴} و ۳۸ ایزوله (۹۲/۷٪) دارای ژن *bla*_{OXA-۱۰} بودند (۱۱۰).

- در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Lee و همکاران در کره جنوبی بر روی ۲۵۲ نمونه بالینی سودوموناس آئروژینوزا جهت تشخیص ژنهای *bla*_{TEM} و *bla*_{SHV} صورت پذیرفت حضور این ژنها شناسایی نگردید. در این مطالعه ژن *bla*_{PSE-۱} (۶/۳٪)، ژن *bla*_{OXA-۱۰} (۱۳/۱٪)، ژن *bla*_{OXA-۴} (۴/۳٪) و ژن *bla*_{OXA-۲} (۲/۳٪) جداسازی شدند (۱۱۱).

فصل چہارم

مواد و روشہا

۴-۱-نوع پژوهش

پژوهش اخیر یک مطالعه توصیفی- مقطعی (میزان شیوع Prevalence Rate) می باشد.

۴-۲-جامعه مورد مطالعه

کلیه ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده از نمونه های بالینی ارسالی به آزمایشگاهای بیمارستانهای مختلف شهر های تهران و قزوین بطور تصادفی مورد ارزیابی قرار گرفت تا میزان شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی مشخص گردد. سپس در سویه های مقاوم (فنوتیپی) حضور ژن های bla_{VEB-1} ، bla_{GES-1} و bla_{OXA} مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۴-۱: متغیرها

عنوان متغیر	مستقل	وابسته	کمی		کیفی		تعریف علمی	مقیاس
			پیوسته	گسسته	اسمی	رتبه ای		
مقاومت به آنتی بیوتیک های مورد استفاده						*	براساس نتایج فنوتیپی و اندازه گیری قطر هاله عدم رشد	حساس/مقاوم یا مقاومت حد واسطه)
فنوتیپ <i>ESBL</i>					×		بررسی مقایسه ای افزایش قطر هاله عدم رشد به میزان بیش از 5mm	دارد/ندارد
حضور ژن های bla_{VEB-1} ، bla_{OXA} ، bla_{GES-1}					×		انجام PCR و انجام الکتروفورز محصول PCR انجام الکتروفورز و بکارگیری سایز مارکرهای مربوطه و مشاهده چشمی باند	حضور دارد/ندارد

۳-۴- واحد پژوهش

۱۷۶ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده از بیمارستان‌های شهرهای تهران و قزوین.

۴-۴- متغیرها

سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا: متغیر زمینه‌ای-پیوسته اسمی

*bla*_{VEB-۱}، *bla*_{GES-۱} و *bla*_{OXA}: متغیر زمینه‌ای-پیوسته اسمی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی: متغیر زمینه‌ای - پیوسته اسمی

۴-۵- روش انتخاب نمونه

حجم نمونه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شده است:

$$n = \frac{Z_{1-\alpha/2}^2 \times P \times (1-P)}{d^2} = ۱۷۶$$

۴-۶- روش اجرای پژوهش

۴-۶-۱- جمع‌آوری نمونه‌ها

جهت انجام این مطالعه در مجموع ۱۷۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان امام حسین (ع) شهر تهران و بیمارستان‌های بوعلی، کوثر، قدس و شهید رجایی شهر قزوین جمع‌آوری گردید. باکتری‌ها از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار، خون، خلط، زخم، و تراشه جدا شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه مجدداً تایید هویت شدند. ایزوله‌های تایید شده، در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایشات بعدی نگهداری شدند.

۴-۶-۲- شناسایی و تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده

جهت تأیید ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده، از تست‌های بیوشیمیایی مختلف استفاده شد. این تست‌ها شامل رشد در محیط مک‌کانکی آگار، تست اکسیداز، واکنش در محیط $TSI^{۶۴}$ ، تست $OF^{۶۵}$ بررسی تحرک، رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد و تولید پیوسیانین در محیط مولر هینتون آگار بود.

۴-۶-۳- محیط کشت‌های مورد نیاز

محیط‌های به کار رفته جهت تعیین هویت سودوموناس آئروژینوزا عبارتند از:

محیط مک‌کانکی آگار، اکسیداتیو-فرمانتاتیو، تریپل شوگر آیرون آگار، $SIM^{۶۶}$ و مولر هینتون آگار.

۴-۶-۳-۱- محیط مک‌کانکی آگار

محیط مک‌کانکی آگار برای بررسی مصرف قند لاکتوز توسط باکتری‌ها به کار می‌رود. این محیط حاوی پپتون، نمک صفرا، لاکتوز، کلرید سدیم و نوترال رد می‌باشد.

۴-۶-۳-۲- محیط OF

این محیط برای تشخیص نوع مصرف قند در باکتری‌های گرم منفی میله‌ای غیر تخمیری مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۴-۶-۳-۳- محیط TSI

محیط TSI برای تشخیص مصرف قندهای گلوکز، لاکتوز، ساکاروز و همچنین تولید گاز سولفید هیدروژن توسط باکتری به کار می‌رود.

۴-۶-۳-۴- محیط SIM

محیط SIM ، محیطی نیمه جامد است و برای تعیین تولید SH_2 ، اندول و حرکت به کار می‌رود.

^{۶۴} - Triple Sugar Iron Agar

^{۶۵} - Oxidative - Fermentation

^{۶۶} Sulfide Indol Mutility

۴-۶-۴- نگهداری ایزوله‌ها

پس از تأیید نهایی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های بالینی مختلف حدود ۱ الی ۴ کلنی به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری حاوی محیط تریپتی کیس سوی براث واجد ۲۰ درصد گلیسرول منتقل و پس از حل نمودن کلنی‌ها در محیط مزبور، میکروتیوب‌ها به مدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس با دیدن کدورت محیط که ناشی از رشد باکتری‌ها می‌باشد، میکروتیوب‌ها را ابتدا به مدت ۱ الی ۴ ساعت در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد و سپس جهت نگهداری بلند مدت به فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد منتقل نمودیم (نگهداری در یخچال قبل از فریزکردن نمونه‌ها جهت جلوگیری از شوک سرمایی مفید می‌باشد). در طی مدت زمان نگهداری ایزوله‌ها تا شروع مرحله تشخیص مولکولی، به صورت تصادفی به فاصله هفتگی، ماهانه و سه ماهه تعدادی از نمونه‌ها از فریزر خارج و بعد از دفریز شدن در محیط مولر هینتون براث دوباره کشت داده شدند تا اطمینان حاصل شود در طی مدت زمان فریز شدن باکتری، از قدرت رشد کنندگی آنها کاسته نشده باشد.

۴-۶-۵- بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش Disk Diffusion Method :

تعیین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا توسط تست آنتی‌بیوگرام (دیسک دیفیوژن) انجام شد که متداول ترین تست مورد استفاده جهت بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بر روی آگار می باشد. این تست بر اساس انتشار در دیسک و بر اساس دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (CLSI) به استفاده از ۵ دیسک آنتی بیوتیک مختلف انجام شد. از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ جهت کنترل کیفی آزمون استفاده شد (۹۴).

۴-۶-۵-۱- مواد و وسایل مورد نیاز تست آنتی بیوگرام

- محیط کشت مولر هیتون آگار
- دیسک‌های آنتی بیوتیکی (شرکت MAST، انگلستان):
- آزترئونام (۳۰ میلی گرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میلی گرم)، سفیدوکسیم (۳۰ میلی گرم)، سفتازیدیم (۳۰ میلی گرم)،
سفتریاکسون (۳۰ میلی گرم)، براساس جداول استاندارد CLSI.
- اسیدسولفوریک و کلریدباریم جهت تهیه نیم مک فارلند.
- سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳
- پلیت‌های یکبار مصرف ۱۰ سانتی متری
- سواب پنبه‌ای استریل و پنس
- لوله آزمایش حاوی ۱ تا ۲ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل
- لوله حاوی استاندارد نیم مک فارلند
- خط کش مخصوص اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد

۴-۶-۵-۲- تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند

برای تهیه سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند، از کلنی‌های تازه (۲۴-۱۸ ساعته) و خالص سودوموناس آئروژینوزا در لوله حاوی سرم فیزیولوژی استریل تلقیح کرده، سپس با مقایسه کدورت آن با کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند، سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند تهیه نمودیم. جذب نوری یا OD این سوسپانسیون در طول موج ۶۲۵ نانومتر بایستی حدود ۰/۰۸ تا ۰/۱ باشد.

۴-۵-۶-۳- کنترل کیفی دیسک‌ها

تمامی دیسک‌های آنتی بیوتیکی قبل از استفاده برای آزمایش، از لحاظ کیفیت کنترل شدند. برای این منظور ابتدا سوسپانسیون میکروبی (معادل نیم مک فارلند) به روش مستقیم از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳ تهیه شد، سپس توسط سوآپ استریل روی محیط مولر هینتون آگار کشت خطی داده شد. در نهایت، دیسک‌ها با فاصله ۲۲ میلیمتر از یکدیگر و ۱۶ میلی‌متر از جداره پلیت بر روی محیط قرارداده شدند.

۴-۵-۶-۴- روش کار تست آنتی بیوگرام

جهت انجام تست آنتی بیوگرام ابتدا سوسپانسیون باکتریایی معادل غلظت نیم مک فارلند تهیه کردیم. به این صورت که چند کلنی خالص سودوموناس آئروژینوزا را در لوله‌های ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی تلقیح کرده، سپس لوله‌ها را در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار دادیم تا به کدورت مورد نظر برسند (کدورت معادل نیم مک فارلند). در مرحله بعد به کمک سوآپ پنبه‌ای کشت چمنی روی محیط مولر هینتون آگار انجام دادیم. پس از گذشت ۱۵ دقیقه از کشت، دیسک‌های آنتی بیوتیکی بر روی محیط کشت قرار داده شدند و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از قرار دادن دیسک‌ها، پلیت‌ها در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت انکوبه گردید. قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه‌گیری و تفسیر آن با توجه به استانداردهای CLSI انجام گرفت و بر حسب قطر هاله عدم رشد، ایزوله‌ها به ۳ گروه حساس، حد متوسط و مقاوم تقسیم بندی شدند (۹۴).

۴-۶-۶-۴- آزمایش دیسک ترکیبی جهت تشخیص فنوتیپی ESBLs ها

۴-۶-۶-۱- وسایل و مواد لازم

- آنتی بیوتیک های سفنازیدیم، سفوتاکسیم، آزترونام، سفیدوکسیم و سفتریاکسون
- محلول استاندارد نیم مک فارلند
- سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ATCC ۲۷۸۵۳

▪ پلیت‌های یک بار مصرف ۱۲ سانتی متری

▪ سوپ‌های پنبه‌ای استریل و پنس

▪ لوله‌های آزمایش حاوی ۱ تا ۲ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل

▪ خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد

۴-۶-۲- روش کار تست غربالگری **ESBLs**: ابتدا تمامی ایزوله‌ها بر طبق دستورالعمل استاندارد با استفاده از روش دیسک آگار دیفیوژن نسبت به آنتی بیوتیک‌های سفنازیدیم، سفوتاکسیم، آزترونام، سفیدوکسیم و سفتریاکسون مورد غربالگری قرار می‌گیرند.

▪ تست تاییدی **ESBLs**: ایزوله‌هایی دارای کاهش حساسیت نسبت به هر کدام از آنتی بیوتیک‌های مرحله غربالگری توسط تست تاییدی تولید **ESBLs** به روش دیسک ترکیبی (Combined Disk Method) مورد بررسی قرار می‌گیرند. در این آزمون از دیسکهای سفنازیدیم و سفنازیدیم / کلاولانیک اسید، سفوتاکسیم و سفوتاکسیم / کلاولانیک اسید استفاده می‌شود. نتایج طبق دستورالعمل CLSI تفسیر می‌گردد بدین صورت که افزایش قطر هاله عدم رشد دیسک ترکیبی معادل $5 \text{ mm} \geq$ در مقایسه با قطر هاله عدم رشد دیسک به تنهایی باشد از نظر **ESBLs** مثبت در نظر می‌گیریم.

▪ در آزمون‌های فنوتیپی از *E.coli* ATCC ۲۵۹۲۲ به عنوان کنترل منفی و از *E.coli* ATCC ۳۵۲۱۸ و *Klebsiella pneumonia* ATCC ۷۰۰۶۰۳ به عنوان کنترل مثبت استفاده می‌شود (۹۴).

۴-۶-۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

همه ایزوله‌های مولد **ESBL** از نظر حضور ژن‌های *bla*OXA، *bla*VEB-۱ و *bla*GES-۱ با استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۴-۲) بررسی شدند.

سپس شرایط واکنش PCR جهت تکثیر تک ژن‌ها با سویه استاندارد بهینه‌سازی شد. در نهایت، ایزوله‌های بالینی به منظور شناسایی هر دو ژن ارزیابی شدند.

۴-۶-۷-۱- استخراج DNA:

مواد و وسایل مورد نیاز

- سمپلر و سر سمپلر
- میکروتیوب ۱/۵
- شیکر (shaker)
- میکروسانتریفیوژ
- انکوباتور ۳۷ درجه
- بن ماری ۱۰۰ درجه سانتی گراد
- نانودراپ

- مراحل استخراج DNA با استفاده از روش boiling به شرح ذیل انجام گرفت:

۱. برای استخراج DNA به روش boiling نیاز به کلنی‌هایی از کشت تازه (۲۴ ساعته) داریم، به این منظور نمونه‌هایی که در آزمون فنوتیپی از نظر تولید ESBLs مثبت شدند برای استخراج DNA کشت داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و رشد ایزوله‌های مورد نظر آماده استخراج شدند.

۲. ابتدا ۳ تا ۵ کلنی از هر نمونه را داخل ویال اپندورف ۱/۵ میلی لیتر حاوی ۲۰۰ μ ل آب مقطر استریل حل کردیم.

۳. با استفاده از شیکر آن قدر نمونه‌ها را shake می‌کنیم تا اینکه کاملاً حل شوند.

۴. ویال‌ها را به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه، داخل بن ماری جوش (۱۰۰ درجه سانتی گراد)، قرار دادیم به طوری که سطح آب جوش دو سوم ویال را در بر گیرد.

۵. سپس ویال ها را به مدت ۵-۱۰ دقیقه، با دور ۱۴۰۰۰ g (با استفاده از سانتریفوژاپندورف)، سانتریفوژ کردیم و محلول رویی(سوپرناتانت) ویال ها که حاوی DNA می باشد، برای انجام واکنش PCR به اپندورف استریل منتقل شد.

استخراج به این روش به صورت روزانه انجام گرفت و برای حصول به نتایج بهتر در PCR، DNA استخراج شده ذخیره نمی شد.

۴-۶-۷-۲-ارزیابی کمی DNA استخراج شده

با روش UV اسپکتروفتومتری غلظت و خلوص نمونه DNA استخراج شده به کمک جذب نوری در طول موج ۲۶۰ nm و ۲۸۰ با استفاده از رابطه ی زیر بدست می آید.

ضریب خاموشی DNA \times عکس رقت \times OD قرائت شده در ۲۶۰ نانومتر = ($\mu\text{g/ml}$) مقدار DNA

ضریب خاموشی DNA، ۵۰ می باشد. ابتدا نمونه DNA استخراج شده را به نسبت ۵ به ۴۹۵ میکرولیتر با آب مقطر استریل رقیق کرده و سپس میزان جذب نوری یا OD آن را در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری کردیم.

۴-۶-۷-۳- مواد مورد نیاز جهت انجام PCR:

- dNTPs (نوکلئوتیدها)
- پرایمر پیشرو (F) و پیرو (R)
- DNA الگو
- Taq DNA Polymerase
- آب مقطر دیونیزه
- بافر ۱۰x-PCR

۴-۶-۷-۴- پروسه انجام واکنش PCR

۳-۶-۷-۴-۱- مواد و وسایل مورد نیاز

- ست سمپلر و سر سمپلر آبی، زرد، کریستالی
- میکروتیوب ۲۰۰ μ l-۵۰۰ μ l
- دستگاه ترموسایکلر
- ظرف یخ (تمام مراحل تهیه سوسپانسیون اصلی و افزودن DNA الگو و آنزیم Taq DNA polymerase باید بر روی یخ انجام گیرد).
- آب مقطر دیونیزه
- سویه های کنترل مثبت
- پرایمرهای اختصاصی
- Master Mix

۴-۶-۸- تکثیر آنزیم های OXA و GES-۱ و VEB-۱

۴-۶-۸-۱- پرایمرهای مورد استفاده

- پرایمرهای مورد استفاده در PCR به صورت کاملاً اختصاصی و مکمل ناحیه مورد نظر از DNA هدف طراحی می شوند. توالی پرایمرهای مورد استفاده بر اساس مطالعه Shibata و همکارانش بوده و توسط شرکت ماکروژن کره سنتز شده است. توالی و اندازه قطعات تکثیر شده توسط این پرایمرها در جدول ۴-۲ ذکر شده است.

جدول ۴-۲: پرایمرهای مورد استفاده آزمون PCR

ژن	توالی پرایمر	رفرنس	طول قطعه پرایمر
OXA-۴	F: ۵-TCAACAGATATCTCTACTG TT -۳ R: ۵-TTTATCCCATTGGAATATG GT -۳	۱۱۰	۲۱۶
OXA-۱۰ (group I)	F: ۵-TCT TTC GAG TAC GGC ATT AGC-۳ R: ۵-CCA ATG ATG CCC TCA CTT TCC-۳	۱۱۲	۷۵۹
VEB-۱	F: ۵-CGA CTT CCA TTT CCC GAT GC-۳ R: ۵-GGA CTC TGA AAC TAC GC -۳	۱۱۲	۶۵۰
OXA-۲ (group II)	F: ۵-GCC AAA GGC ACG ATA GTT GT-۳ R: ۵-GCG TCC GAG TTG ACT GCC GG -۳	۱۱۳	۷۰۱
OXA-۱ (group III)	F: ۵-AGC CGT TAA AAT TAA GCC C-۳ R: ۵-CTT GAT TGA AGG GTT GGG CG -۳	۱۱۴	۹۰۸
GES-۱	F: ۵-ATG CGC TTC ATT CAC GCA C-۳ R: ۵-CTA TTT GTC CGT GCT CAG G -۳	۱۱۵	۸۶۳

۴-۶-۸-۲- حجم و غلظت مواد PCR جهت تکثیر آنزیم‌های *blaOXA* ، *blaGES-۱* و *blaVEB-۱*:

واکنش PCR برای هر یک از ژن‌های در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر انجام گرفت. غلظت و حجم نهایی مواد PCR در جدول ۴-۳ ذکر شده است.

جدول ۴-۳: حجم و غلظت نهایی مواد PCR برای ژن‌های *bla_{GES-۱}*، *bla_{VEB-۱}* و *bla_{OXa}*

غلظت	حجم (میکرولیتر)	ترکیبات واکنش
–	۲۱/۷۵	Master Mix
۱۰ pmol	۱	Primer Forward
۱۰ pmol	۱	Primer Reverse
–	۰/۲۵	Taq pol ۵ u/μl
–	۱	Template DNA
–	۲۵	حجم نهایی

۴-۶-۸-۳- برنامه دمایی جهت تکثیر ژن‌های *bla_{OXa}*، *bla_{GES-۱}* و *bla_{VEB-۱}*

برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن‌های *bla_{OXa}*، *bla_{GES-۱}* و *bla_{VEB-۱}* در جدول ۴-۴ نشان داده شده است.

جدول ۴-۴: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت تکثیر ژن های *bla_{OXA}*، *bla_{GES-۱}* و *bla_{VEB-۱}*

Gene	initial denaturation	denaturation	Annealing	extension	final extension
<i>bla_{OXA-۱}</i>	۹۶°C for ۵ min	۹۶°C for ۱ min	۵۶°C for ۱ min	۷۲°C for ۱ min	۷۲°C for ۱۰ min
<i>bla_{OXA-۲}</i>	۹۶°C for ۵ min	۹۶°C for ۱ min	۵۰°C for ۱ min	۷۲°C for ۱ min	۷۲°C for ۱۰ min
<i>bla_{OXA-۳}</i>	۹۶°C for ۵ min	۹۶°C for ۱ min	۶۲°C for ۱ min	۷۲°C for ۱ min	۷۲°C for ۱۰ min
<i>bla_{OXA-۱۰}</i>	۹۶°C for ۵ min	۹۶°C for ۱ min	۵۲°C for ۱ min	۷۲°C for ۱ min	۷۲°C for ۱۰ min
<i>bla_{VEB-۱}</i>	۹۶°C for ۵ min	۹۶°C for ۱ min	۵۵°C for ۱ min	۷۲°C for ۱ min	۷۲°C for ۱۰ min
<i>bla_{GES-۱}</i>	۹۶°C for ۵ min	۹۶°C for ۱ min	۵۲°C for ۱ min	۷۲°C for ۱ min	۷۲°C for ۱۰ min



شکل ۴-۱: دستگاه ترموسایکلر Applied biosystems (ساخت کشور امریکا) استفاده شده در مطالعه حاضر

۴-۶-۹- آشکارسازی و الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز

این مرحله از آزمایشات به منظور ارزیابی محصولات PCR انجام شد .

۴-۶-۹-۱- مواد و وسایل مورد نیاز برای الکتروفورز

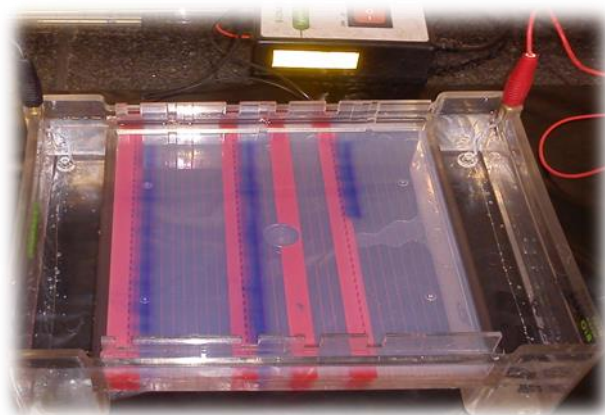
- دستگاه الکتروفورز
- سمپلر و سر سمپلر
- پودر آگارز
- DNA Size marker یا DNA Ladder (۱۰۰ bp)
- Loading buffer و اتیدیوم بروماید
- TBE buffer X

▪ جهت شناسایی DNA و محصول PCR در داخل ژل نیاز به رنگ آمیزی ژل داریم تا محل قرارگیری محصولات ما را مشخص کند، محلول‌های مختلفی برای رنگ آمیزی استفاده می‌شود، محلول مورد استفاده در این مطالعه اتیدیوم بروماید بود که جزء مواد اینترکاله شونده می‌باشد، این محلول از طریق قرارگیری در بین بازهای DNA محل محصول را در سطح ژل مشخص می‌کند، جهت شناسایی بایستی ژل را در معرض اشعه ماوراءبنفش قراردهیم تا اتیدیوم بروماید فلورسانس نارنجی ایجاد نماید. از مخاطرات استفاده از این محلول سرطان‌زایی آن می‌باشد لذا در هنگام استفاده باید کلیه نکات ایمنی رعایت و از دستکش و ماسک مناسب و استاندارد استفاده نمود. جهت تهیه محلول استوک و ذخیره بایستی ۱۰ میلی‌گرم از پودر تجاری اتیدیوم بروماید را در ۱ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و در ظرف دربسته و به دور از نور مستقیم نگهداری نمائیم.

۴-۶-۹-۳-انجام الکتروفورز و روش تهیه ژل

در این مطالعه با توجه به وزن ژن‌های مورد نظر، ژل ۱٪ تهیه شد. برای تهیه ژل ۱٪ در قالب کوچک، ۱/۳ گرم پودر آگارز در ۱۳۰ میلی لیتر بافر TBE ۱X حل کرده و آن را می‌جوشانیم تا کاملاً آگارز در داخل بافر حل شود و محلول شفاف گردد. پس از رسیدن دمای محلول آگارز ساخته شده به حدود ۴۵ تا ۵۰ درجه به ازای هر ۱۰ میلی لیتر ژل، یک میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید اضافه شده و در نهایت ژل داخل قالب ریخته می‌شود. بعد از بستن کامل ژل ابتدا شانه را درآورده و ژل در داخل تانک الکتروفورز قرار می‌گیرد. داخل تانک به حدی بافر TBE می‌ریزیم که روی ژل را کاملاً بپوشاند. ۵ میکرولیتر از محصول PCR را با یک میکرولیتر بافر سنگین کننده کاملاً مخلوط کرده و سپس به آرامی داخل چاهک‌ها قرار می‌گیرد. از آنجایی که DNA شارژ منفی دارد، به همین علت برای الکتروفورز شدن باید نمونه‌ها به طرف قطبی منفی باشد تا موقع الکتروفورز به سمت قطب مثبت حرکت کند. تانک الکتروفورز به منبع برق وصل شده و ولتاژ

تنظیم شده (۷۰-۸۰V) و الکتروفورز شروع می‌شود. وقتی نمونه ۷۵٪ طول ژل را طی کرد ژل از تانک خارج شده و با دستگاه ترانس لومیناتور مشاهده می‌شود. می‌توان عکس ژل را توسط دستگاه ژل داک تهیه کرد.



تصویر ۴-۲: تانک الکتروفورز مورد استفاده در مطالعه حاضر

۴-۶-۱۰- تعیین توالی^{۶۷}

محصول PCR هر یک از ژن‌ها جداگانه از نظر تائید حضور ژن توسط شرکت ژن فن آوران به شرکت MacroGene (کره جنوبی) ارسال شد. پس از دریافت نتایج توالی‌ها با نرم افزار chromas بررسی و سپس جهت آنالیز ابتدا در NCBI ، blast شده و با ژن‌های سویه‌های استاندارد ثبت شده در این بانک ژنی alignment انجام شد.

^{۶۷} Sequencing

REP-PCR - ۱۱-۶-۴

همه ایزوله های مولد ESBL با استفاده از پرایمر های اختصاصی (جدول ۵-۴) به روش REP-PCR بررسی شدند.

جدول ۵-۴: پرایمرهای بکار رفته جهت انجام REP-PCR (۱۱۶)

REP _۱ ۵'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-۳	پرایمر های REP-PCR
REP _۲ ۵'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-۳	

جدول ۶-۴: برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر جهت انجام REP-PCR

ژن	initial denaturation	denaturation	annealing	extension	final extension
REP-PCR	۹۴°C for ۱۰ min	۹۴°C for ۱ min	۴۵°C for ۱ min	۷۲°C for ۲ min	۷۲°C for ۱۶ min

فصل پنجم

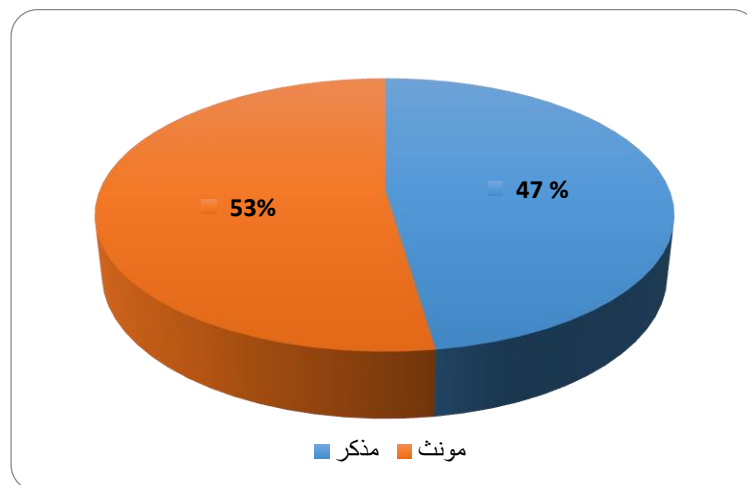
نتایج

۱-۵- جمع آوری نمونه‌ها:

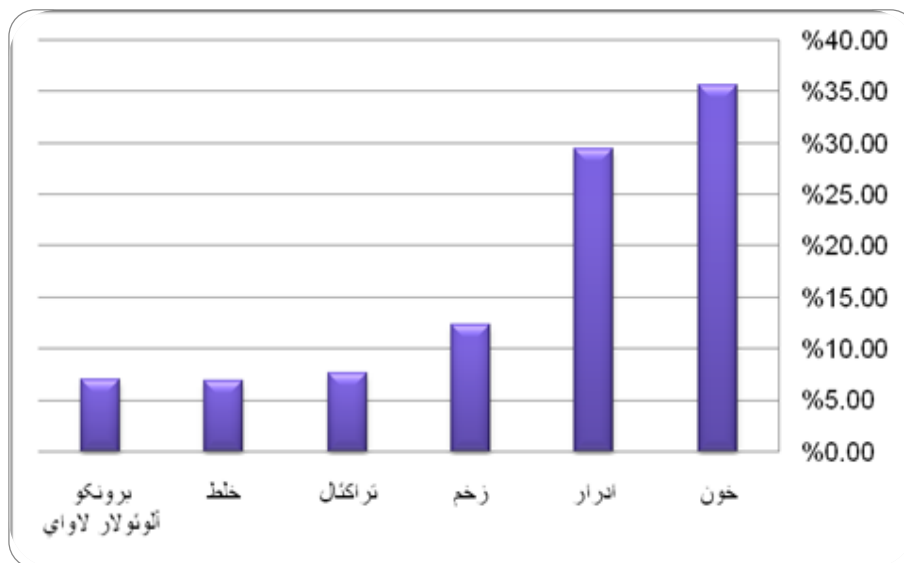
در این مطالعه توصیفی - مقطعی، ۱۷۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی مختلف شامل ادرار، خون، برونکوآلوئولار لاواژ، زخم، خلط و تراشه از بیمارستان امام حسین (ع) شهر تهران و بیمارستان های بوعلی، شهید رجائی، کوثر و ولایت شهر قزوین جمع آوری گردید.

۵-۲- توزیع فراوانی ایزوله‌های جمع آوری شده بر اساس جنسیت و نوع نمونه بالینی:

از ۱۷۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای جمع آوری شده از نمونه های بالینی، ۵۲/۹۳ (۳۰/۰۷٪) ایزوله مربوط به نمونه‌های ادرار، ۶۲/۱۹ (۳۵/۳۳٪) ایزوله مربوط به خون، ۱۱/۹۰ (۶/۷۶٪) ایزوله مربوط به برونکو آلوئولار لاواژ، ۱۹/۱۸ (۱۰/۸۹٪) ایزوله مربوط به زخم، ۱۲/۵۷ (۷/۱۴٪) ایزوله مربوط به خلط و ۱۷/۲۰ (۹/۷۷٪) ایزوله مربوط به تراشه بود (نمودار ۵-۲). از نمونه‌های بالینی مورد بررسی، ۸۳ (۴۷٪) نمونه مربوط به جنس مرد و ۹۳ (۵۳٪) نمونه مربوط به زنان بودند که در نمودار ۵-۱ نشان داده شده است.



نمودار ۵-۱: توزیع فراوانی نسبی ایزوله‌های جمع آوری شده بر اساس جنسیت



نمودار ۵-۲: توزیع فراوانی نمونه‌های بالینی مختلف به کار رفته در این مطالعه

۵-۳- توزیع فراوانی ایزوله‌های جمع‌آوری شده بر اساس بخش جدا شده:

از ۱۷۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای جمع‌آوری شده از نمونه‌های بالینی، ۶۶ ایزوله (۳۷/۲٪) از بخش مراقبتهای ویژه، ۴۲ ایزوله (۲۴/۱٪) از بخش داخلی، ۴۰ ایزوله (۲۲/۹٪) از بخش عفونی، ۱۷ ایزوله (۹/۸٪) از بخش جراحی، ۸ ایزوله (۴/۵٪) از بخش جراحی اعصاب و ۳ ایزوله (۱/۵٪) از بخش اعصاب، جدا سازی شده است. (جدول ۵-۱)

جدول ۵-۱: جدول فراوانی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای جمع آوری شده بر حسب بخش بیمارستانی

بخش فراوانی	داخلی	عفونی	مراقبت ویژه	اعصاب	جراحی	جراحی اعصاب
تعداد ایزوله جدا شده	۴۲	۴۰	۶۶	۳	۱۷	۸
درصد	۲۴/۱	۲۲/۹	۳۷/۲	۱/۵	۹/۸	۴/۵
تعداد کل	۱۷۶					

۵-۴- تأیید ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا:

جهت تأیید ایزوله ها از تست های میکروب شناسی و بیوشیمیایی مختلف استفاده شد. این تست ها شامل بررسی میکروسکوپی، رشد در محیط مک کانکی آگار، تست اکسیداز، واکنش در محیط TSI، تست OF، بررسی تحرک، رشد در ۴۲ درجه سانتی گراد، رشد در محیط سیتريمید آگار و تولید پیگمان در محیط مولر هینتون آگار بود.



تصویر ۵-۱: نتیجه تست های بیوشیمیایی انجام شده در مطالعه حاضر

۵-۵- تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی:

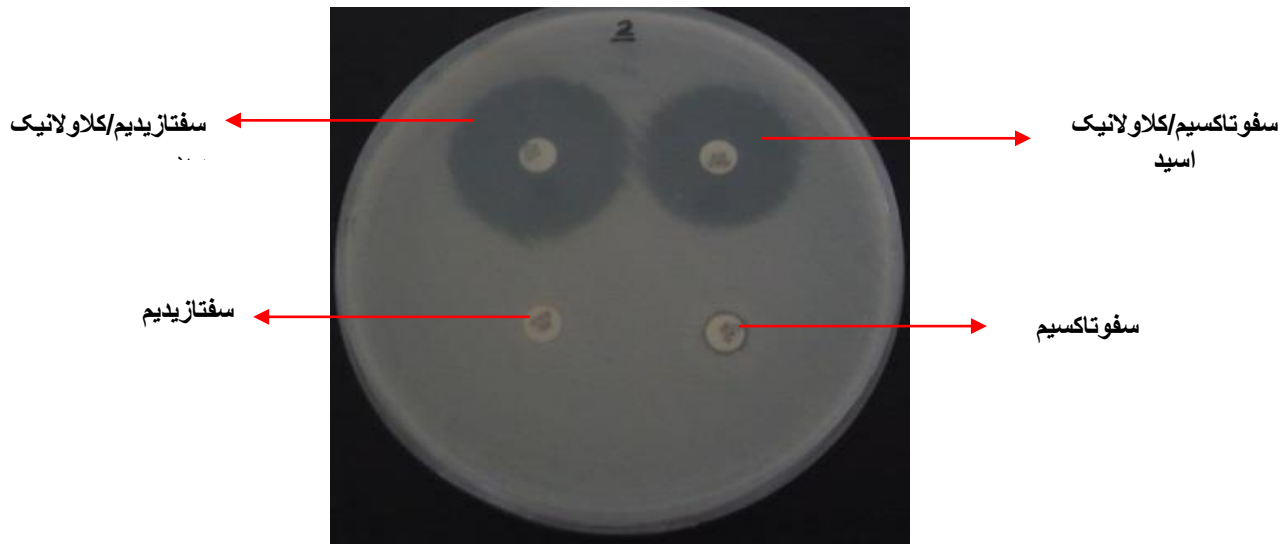
الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا در جدول ۵-۲ بیان شده است. در این مطالعه بیشترین میزان مقاومت مربوط به آنتی بیوتیک سفپودوکسیم (۹۸/۵٪) و سفوتاکسیم (۵۳٪) و کمترین میزان مقاومت مربوط به سفتازیدیم (۳۶/۵٪) گزارش شد.

جدول ۵-۲: بررسی غربالگری ایزوله‌های مولد ESBL در ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده در این مطالعه

آنتی بیوتیک	مقاوم تعداد(٪)	حدواسط تعداد(٪)	حساس تعداد(٪)
سفپودوکسیم	۱۷۳ (۹۸/۵)	–	۳ (۱/۵)
سفوتاکسیم	۹۳ (۵۳)	۶۸ (۳۸/۷)	۱۵ (۸/۳)
سفتریاکسون	۸۱ (۴۶/۲)	۵۲ (۲۹/۴)	۴۳ (۲۴/۴)
آزترونام	۶۶ (۳۷/۶)	۴۳ (۲۴/۴)	۶۷ (۳۸)
سفتازیدیم	۶۴ (۳۶/۵)	۱۱ (۶)	۱۰۱ (۵۷/۵)

۵-۵-۱- نتایج آزمون تاییدی تولید ESBL :

در روش دیسک ترکیبی از دیسکهای ۳۰ میکروگرمی سفتازیدیم و سفوتاکسیم در مجاورت دیسکهای مذکور به همراه ۱۰ میکروگرم کلاولانیک اسید در محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. در صورتی که قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسکهای شامل کلاولانیک اسید در مقایسه با بدون آن ۵ میلی متر و یا بیشتر باشد مولد بتالاکتاماز طیف وسیع در نظر گرفته می شود. در این مطالعه از ۱۷۶ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزا، ۱۳۶ (۷۷/۳۷٪) ایزوله تولید کننده دارای ESBL گزارش شدند.



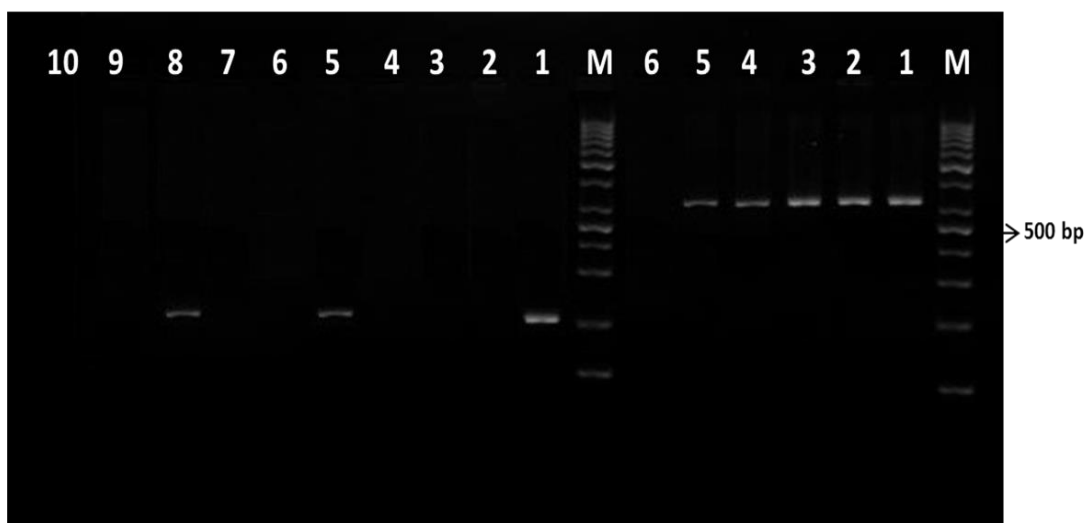
تصویر ۵-۲: تست تاییدی فنوتیپی جهت شناسایی ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مولد ESBL

۵-۶- آزمایش PCR برای جدا سازی ژنهای کد کننده:

در ادامه جداسازی ژنهای *bla_{OXA}*، *bla_{VEB-1}* و *bla_{GES-1}* در ایزوله های مولد ESBLs با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و با انجام آزمون PCR انجام شد. از ۱۳۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا مولد ESBLs، ۱۸ ایزوله (۱۳٪) حامل ژن *bla_{OXA-1}*، و ۱۲ ایزوله حامل ژن (۸٪) *bla_{OXA-4}*، و ۱۲ ایزوله حامل ژن (۸٪) *bla_{GES-1}*، و ۱۴ ایزوله حامل ژن (۱۰٪) *bla_{VEB-1}* بودند. جدول مربوط به فراوانی ژنها در جدول ۵-۳ آمده است.

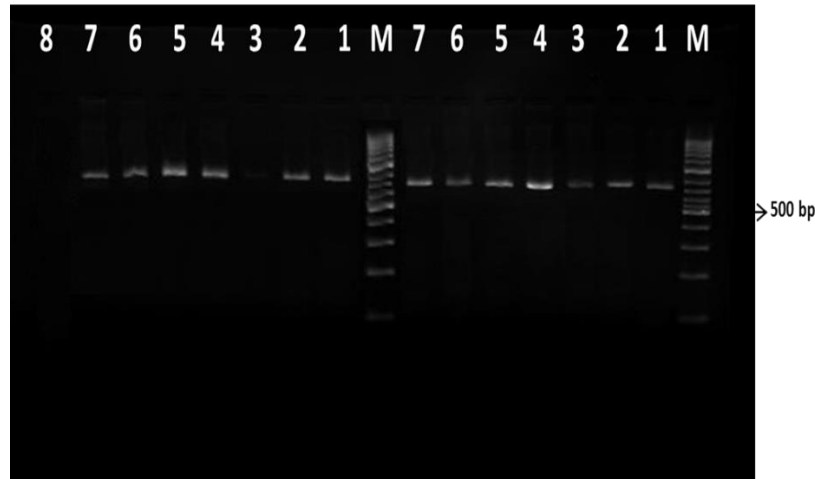
جدول ۳-۵: فراوانی ژنهای *bla*_{OXA}، *bla*_{VEB-۱} و *bla*_{GES-۱} در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مولد ESBL

ژن	تعداد	درصد
<i>bla</i> _{oxa-۱}	۱۸	۱۳
<i>bla</i> _{OXA-۴}	۱۲	۸
<i>bla</i> _{GES-۱}	۱۲	۸
<i>bla</i> _{VEB-۱}	۱۴	۱۰
<i>bla</i> _{OXA-۲}	–	–
<i>bla</i> _{OXA-۱۰}	–	–



تصویر ۳-۵: عکس سمت چپ: محصول PCR از نظر حضور ژن *bla*_{OXA-۴} : ستون DNA: M: مارکر. ستون ۱: کنترل مثبت (ایزوله بالینی تایید توالی شده) ستون ۳: کنترل منفی (*P. aeruginosa* ATCC ۲۷۸۵۳) ستون ۵ و ۸: نمونه بالینی مثبت؛ ستون ۲ و ۴ و ۶ و ۷ و ۹: نمونه بالینی منفی؛ ستون ۱۰: کنترل واکنش PCR (بدون DNA الگو).

عکس سمت راست: محصول PCR از نظر حضور ژن *bla*_{VEB-۱} : ستون DNA: M: مارکر. ستون ۱: کنترل مثبت (ایزوله بالینی تایید توالی شده) ستون ۲-۵: نمونه بالینی مثبت؛ ستون ۶: کنترل واکنش PCR (بدون DNA الگو).

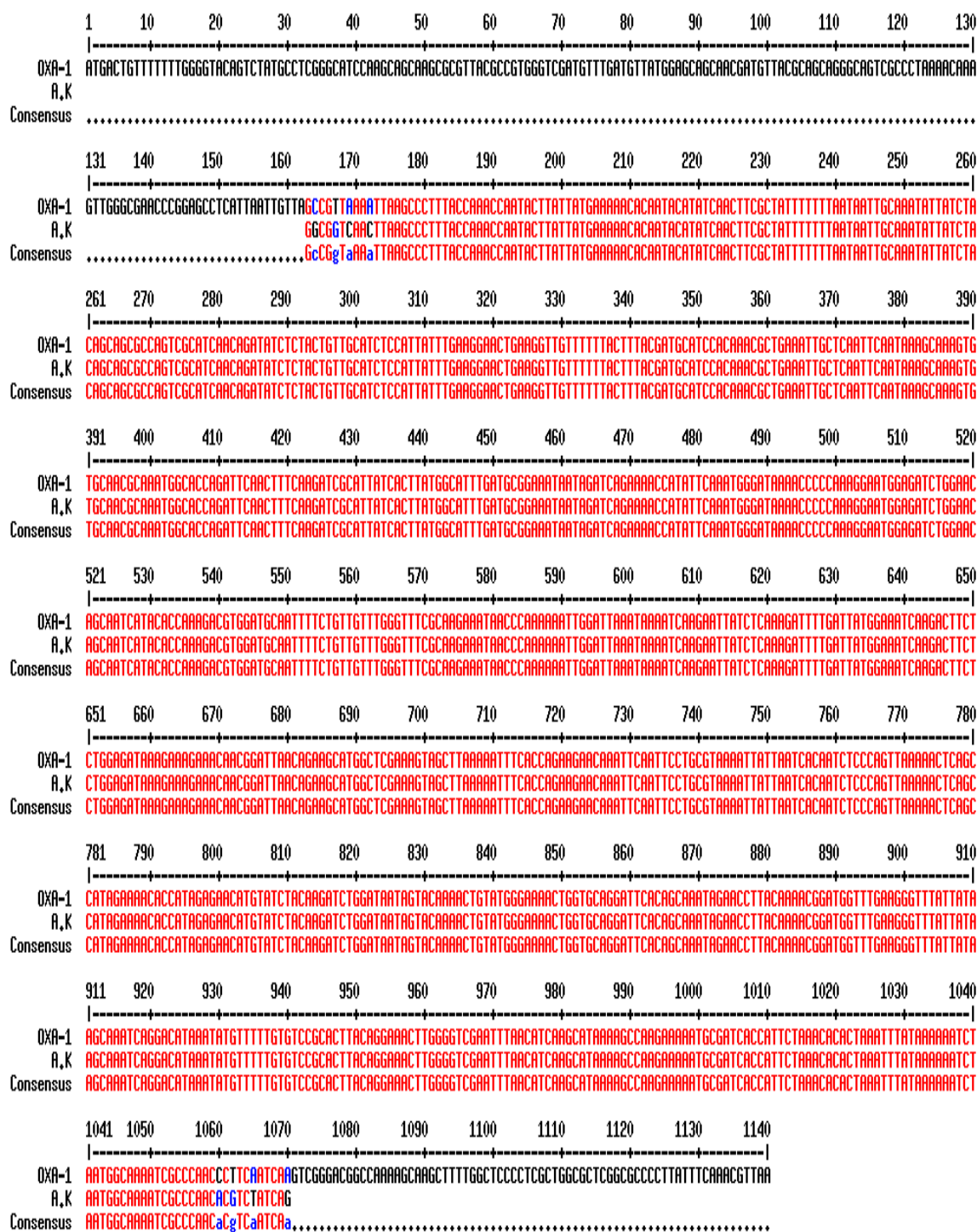


تصویر ۴-۵: عکس سمت چپ: محصول PCR از نظر حضور ژن *bla*_{OXA-1} : ستون DNA : M: مارکر. ستون ۱: کنترل مثبت (ایزوله بالینی تایید توالی شده) ستون ۳: کنترل منفی (*P. aeruginosa* ATCC ۲۷۸۵۳) ستون ۲ و ۴-۷: نمونه بالینی مثبت; ستون ۸: کنترل واکنش PCR (بدون DNA الگو).

عکس سمت راست: محصول PCR از نظر حضور ژن *bla*_{GES-1} : ستون DNA : M: مارکر. ستون ۱: کنترل مثبت (ایزوله بالینی تایید توالی شده) ستون ۲-۷: نمونه بالینی مثبت.

۷-۵- تعیین توالی (Sequencing):

نتایج تعیین توالی نشان داد که در مجموع محصولات PCR مربوط به خانواده *OXA-1* (group III) از نظر حضور ژن *bla*_{OXA-1} مثبت بودند.



*bla*_{OXA-1} ژن Alignment : ۵-۵ تصویر

جدول ۵-۴: توزیع فراوانی نمونه‌های ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای حامل ژنهای *bla*_{OXA-۱}, *bla*_{OXA-۲}, *bla*_{GES-۱} و *bla*_{VEB-۱} بر حسب نوع

نمونه بالینی

مجموع	تراشه	خلط	زخم	برونکو آلئولار لاواژ	خون	ادرار	ژن
<i>bla</i> _{OXA-۱}	۳(٪۲/۲)	۴(٪۲/۹)	–	۱(٪۰/۷)	۳(٪۲/۲)	۷(٪۵/۱)	
<i>bla</i> _{OXA-۲}	۲(٪۱/۵)	–	۴(٪۲/۹)	–	۳(٪۲/۲)	۳(٪۲/۲)	
<i>bla</i> _{GES-۱}	۴(٪۲/۹)	۴(٪۲/۹)	–	–	–	۴(٪۲/۹)	
<i>bla</i> _{VEB-۱}	۴(٪۲/۹)	–	–	–	۸(٪۵/۹)	۲(٪۱/۵)	

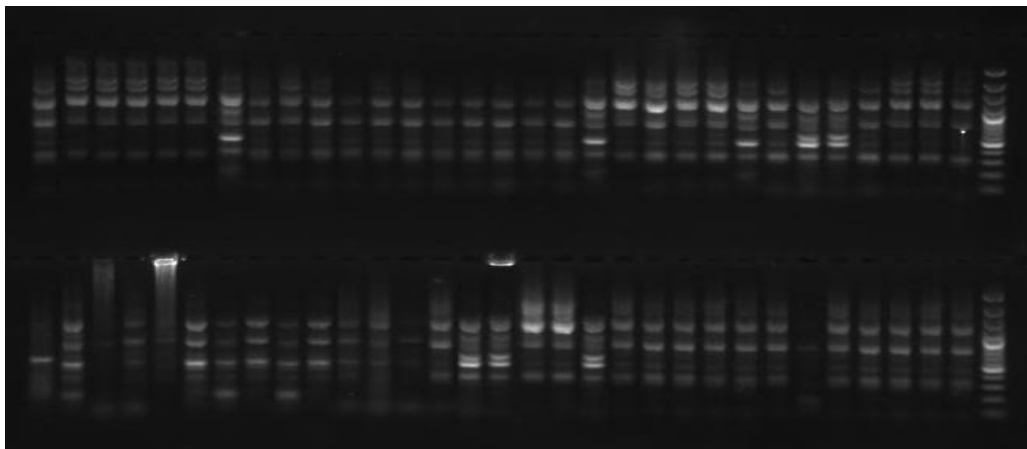
جدول ۵-۵: توزیع فراوانی ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزای حامل ژنهای *bla*_{OXA-۱}, *bla*_{OXA-۲}, *bla*_{GES-۱} و *bla*_{VEB-۱} بر حسب بخش‌های بیمارستان

های مورد مطالعه

مجموع	عفونی	اعصاب	جراحی اعصاب	جراحی	داخلی	مراقبت‌های ویژه	ژن
<i>bla</i> _{OXA-۱}	–	–	۱(٪۰/۷)	۲(٪۱/۵)	۶(٪۴/۴)	۹(٪۶/۶)	
<i>bla</i> _{OXA-۲}	۴(٪۲/۹)	۲(٪۱/۵)	–	۱(٪۰/۷)	۱(٪۰/۷)	۴(٪۲/۹)	
<i>bla</i> _{GES-۱}	۲(٪۱/۵)	–	–	۲(٪۱/۵)	–	۸(٪۵/۹)	
<i>bla</i> _{VEB-۱}	–	–	–	–	۲(٪۱/۵)	۱۲(٪۸/۰/۸)	

۵-۸- REP-PCR

نتایج آزمون REP-PCR نشان داد که در مجموع ایزوله های مولد ESBL در این مطالعه متعلق ۳ کلون به ترتیب A (۸۸٪-۱۲۰)، B (۷٪-۱۰) و C (۴٪-۶) بودند.



تصویر ۵-۶: نتیجه آزمون REP-PCR مربوط به نمونه های ESBL مثبت در این مطالعه

در ادامه با بررسی حضور ژنهای جدا سازی شده در کلونهای مختلف مشخص شد که ژن *bla*_{OXA-۱} به ترتیب بیشتر از کلون A (۱۱٪) و B (۱٪) جدا سازی شدند. همچنین ژن *bla*_{OXA-۴} بیشتر از کلونهای A (۷٪) و C (۱٪) جدا سازی گردید. همچنین ژن *bla*_{GES-۱} بیشتر از ایزوله های متعلق به نوع A (۸٪) جدا سازی شد. همچنین ژن *bla*_{VEB-۱} بیشتر از کلونهای A (۷٪) و B (۲٪) جدا سازی گردید.

جدول ۵-۶: نتایج حاصل از آزمون REP-PCR در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای مولد ESBL

کلون	تعداد	درصد
A	۱۲۰	۸۸
B	۱۰	۷
C	۶	۴
جمع کل	۱۳۶	۱۰۰

همچنین مشخص شد که بیشتر ایزوله های تولید کننده ESBL مربوط به کلونهای شناسایی شده در این مطالعه از بیمارستان بوعلی قزوین (۴۷/۷٪) جداسازی شدند. جدول ۵-۸ توزیع فراوانی کلونهای جدا سازی شده در این مطالعه را از مراکز مختلف بیمارستانی مورد مطالعه را نشان می دهد.

جدول ۵-۷: فراوانی کلونهای جدا سازی شده مختلف حاصل از آزمون REP-PCR در مراکز بیمارستانی این مطالعه

کلون	بیمارستان					مجموع
	بوعلی	کوثر	قدس	رجایی	امام حسین	
A	۵۷ (۴۲٪)	۳۳ (۲۴٪)	–	۱۰ (۷٪)	۲۰ (۱۵٪)	۱۲۰
B	۴ (۲/۵۳٪)	۲ (۱/۱۱٪)	–	–	۴ (۲/۸۰٪)	۱۰
C	۵ (۳/۲۰٪)	–	–	–	۱ (۰/۴٪)	۶
جمع کل	۶۶ (۴۷/۷٪)	۳۵ (۲۵/۵٪)	–	۱۰ (۷/۳٪)	۲۵ (۱۸/۲٪)	۱۳۶

جدول ۵-۸: توزیع فراوانی ژن *bla_{oxa-۱}* در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای متعلق به کلون های جدا سازی شده در این مطالعه

کلون	ژن <i>bla_{oxa-۱}</i>		مجموع
	مثبت	منفی	
A	۱۶ (۱۱٪)	۱۰۴ (۷۷٪)	۱۲۰ (۸۸٪)
B	۲ (۱٪)	۸ (۶٪)	۱۰ (۷٪)
C	–	۶ (۴٪)	۶ (۴٪)
جمع کل	۱۸ (۱۳٪)	۱۱۸ (۸۷٪)	۱۳۶ (۱۰۰٪)

جدول ۴-۹: توزیع فراوانی ژن *bla_{oxA-۴}* در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای متعلق به کلون های جدا سازی شده در این مطالعه

کلون	ژن <i>bla_{oxA-۴}</i>		مجموع
	مثبت	منفی	
A	۱۰ (%۷)	۱۱۰ (%۸۱)	۱۲۰ (%۸۸)
B	–	۱۰ (%۷)	۱۰ (%۷)
C	۲ (%۱)	۶ (%۳)	۸ (%۴)
جمع کل	۱۲ (%۸)	۱۲۴ (%۹۱)	۱۳۶ (%۱۰۰)

جدول ۵-۱۰: توزیع فراوانی ژن *bla_{GES-۱}* در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای متعلق به کلون های جدا سازی شده در این مطالعه

کلون	ژن <i>bla_{GES-۱}</i>		مجموع
	مثبت	منفی	
A	۱۲ (%۸)	۱۰۸ (%۸۰)	۱۲۰ (%۸۸)
B	–	۱۰ (%۷)	۱۰ (%۷)
C	–	۶ (%۴)	۶ (%۴)
جمع کل	۱۲ (%۸)	۱۲۴ (%۹۱)	۱۳۶ (%۱۰۰)

جدول ۵- ۱۱: توزیع فراوانی ژن *bla_{VEB-۱}* در ایزوله های سودوموناس آئروژینوزای متعلق به کلون های جدا سازی شده در این مطالعه

کلون	ژن <i>bla_{VEB-۱}</i>		مجموع
	مثبت	منفی	
A	۱۰ (%۷)	۱۱۰ (%۸۱)	۱۲۰ (%۸۸)
B	۴ (%۲)	۶ (%۴)	۱۰ (%۷)
C	–	۶ (%۴)	۶ (%۴)
جمع کل	۱۴ (%۱۰)	۱۲۲ (%۹۰)	۱۳۶ (%۱۰۰)

فصل ششم

بحث و نتیجه گیری

سودوموناس آئروژینوزا یکی از علل اصلی عفونتهای بیمارستانی شامل پنومونی، عفونت ادراری و باکتری می است. این عفونتها بویژه در بیماران با نقص ایمنی مانند بیماران نوتروپنی یا سرطانی مشاهده می شود. این ارگانیزم یک علت شایع مرگ و میر در بیماران بستری و دچار نقص ایمنی است (۱۱۷). بر اساس مطالعات اپیدمیولوژیکی انجام شده در سراسر جهان اثبات شده است که میزان شیوع الگوهای مختلف مقاومت دارویی در سویه های سودوموناس آئروژینوزا از یک کشور تا کشور دیگر، از یک منطقه جغرافیایی تا منطقه جغرافیایی دیگر و حتی ما بین بیمارستان های مختلف یک ناحیه جغرافیایی می تواند متفاوت باشد (۱۱۸). علیرغم دستاوردهای زیاد در سیستم های مراقبت بیمارستانی و معرفی طیف گسترده ای از عوامل ضد میکروبی، این باکتری همچنان از عوامل رایج ایجاد کننده عفونت در بیماران بستری در بخش های مختلف بیمارستان می باشد (۱۱۹). در حال حاضر مقاومت های آنتی بیوتیکی و علت های آن خیلی مورد توجه است و در موارد بسیاری درمان بیماران با شکست روبرو شده است. با توجه به مقاومت روز افزون این باکتری به دارو های ضد باکتریایی و به خصوص نسبت به ترکیبات بتالاکتام اهمیت مقاومت آن دو چندان می شود. درمان سودوموناس آئروژینوزا به علت وجود مقاومت ذاتی و اکتسابی نسبت به آنتی بیوتیکهای رایج مورد استفاده در بیمارستان به طور فزاینده ای پیچیده شده است (۱۲۰). نه تنها این باکتری ها به صورت ذاتی به دامنه وسیعی از آنتی بیوتیک ها مقاومند، بلکه توانایی افزایش مقاومت را هنگام درمان کسب می کنند (۱۲۱). ESBLs آنزیم هایی هستند که عامل مقاومت به سفالوسپورینهای گسترده طیف مانند سفوتاکسیم، سفتریاکسون و سفتازیدیم می باشند. چنین آنزیم هایی معمولا در کلبسیلا پنومونیه و اشرشیاکولی یافت می شوند و اخیرا با شیوع کمتر در سودوموناس آئروژینوزا یافت شده اند (۱۲۲).

شناسایی تولید ESBLs مهم می باشد. یک نگرانی مهم، گسترش باکتری های مولد ESBLs در بیمارستانها می باشد که منجر به گسترش قابل ملاحظه آنها می گردد. دیگر نگرانی مهم در این زمینه شکست در درمان به دنبال ابتلا عفونت های ناشی از ارگانیزم های مقاوم به علت انتخابهای درمانی محدود می باشد (۱۲۳). استفاده بی

رویه یا اشتباه از آنتی بیوتیک های ضد سودوموناسی منجر به ایجاد سویه های (Multidrug resistance) MDR شده که موجب محدودیت در انتخاب داروهای مناسب جهت درمان شده است (۱۲۳ و ۱۲۴). در حال حاضر ظهور ESBLs یک موضوع نگرانی جدی برای پزشکان و متخصصان کنترل عفونت محسوب می شود.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، بیشترین درصد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های به کار رفته در این مطالعه مربوط به سفیدوکسیم با (۹۸/۵٪) درصد و سفوتاکسیم با (۵۳٪) درصد گزارش گردید. طی مطالعاتی که صادقی و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ۱۰۸ ایزوله سودوموناس آئروژینوزا بدست آمده از بیمارستان های مختلف شهر اراک انجام دادند، ۴۰ ایزوله مقاوم به ایمپنم بودند. در این مطالعه درصد مقاومت آنتی بیوتیکی نسبت به آمیکاسین، ایمپنم، جنتامایسین، سفنازیدیم و سیپروفلوکساسین به ترتیب برابر با ۱۱/۱٪، ۳۷٪، ۱۵/۷٪، ۲۹/۶٪ و ۱۷/۶٪ گزارش شد (۹۹). در مطالعه دیگری که توسط فولادی و همکاران در سال ۸۹ انجام گرفت میزان مقاومت به آنتی بیوتیک های سفوتاکسیم، سفنازیدیم، سفتریاکسون به ترتیب برابر با ۴۳/۶٪، ۲۰/۹٪، ۶۶/۴٪ بود.

در این مطالعه میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین، تتراسیکلین، جنتامایسین به ترتیب برابر ۱۷/۳٪، ۸۶/۴٪ و ۲۵/۵٪ گزارش گردید (۱۰۰). در مطالعه ای که صادقی و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام دادند، میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های سفنازیدیم برابر با ۷۳٪ بود. در ضمن در این مطالعه میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های آمیکاسین، جنتامایسین، و سیپروفلوکساسین به ترتیب برابر با ۷۳٪، ۸۶٪، و ۵۵٪ گزارش گردید (۱۰۱).

در مطالعه حاضر از مجموع ۱۷۶ ایزوله بالینی جدا شده، تعداد ۱۳۶ ایزوله (۷۷/۳۷٪) دارای الگوی فنوتیپی تولید ESBLs مثبت بودند. در مطالعه ای که در سال ۲۰۱۴ توسط فرشاد زاده و همکاران در اهواز انجام پذیرفت از مجموع ۱۸۵ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران سوختگی تعداد ۹۶ ایزوله (۵۱/۹٪) فنوتیپ ESBLs مثبت را نشان دادند (۱۰۳). در سایر نقاط جهان، نتایج مطالعه حاضر از آمار پایین تری برخوردار بود به طوری که در مطالعه Begum و همکاران در بنگلادش در سال ۲۰۱۳ مقدار ایزوله های دارای فنوتیپ ESBLs مثبت برابر ۳۷/۸٪ گزارش گردید (۱۲۵). همچنین در مطالعه Senthamaria و همکاران این میزان برابر با ۴۲/۳٪ گزارش گردید (۱۲۶). در مطالعه دیگری که توسط Zafar و همکاران در مصر انجام گرفت

میزان ایزوله های دارای الگوی فنوتیپی ESBLs برابر با ۷/۴٪ گزارش گردید (۱۲۷). در مطالعه ای که Umadevi و همکاران در سال ۲۰۱۱ در هند انجام دادند میزان ایزوله های ESBLs مثبت برابر با ۱۹/۴٪ گزارش گردید (۱۲۸). در مطالعه دیگری که توسط Woodford و همکاران در انگلستان صورت پذیرفت این مقدار (۳/۷٪) گزارش گردید که پایین تر از مقدار گزارش شده در این مطالعه بود (۱۲۹). در مطالعه ای که در سالهای ۲۰۰۹ توسط Ullah و همکارانش در پاکستان انجام شد از مجموع ۱۰۶ ایزوله سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از بیماران بخش سوختگی، ۳۸ ایزوله ۳۸/۸۵٪ از این نمونه ها دارای الگوی فنوتیپی ESBLs بودند (۱۰۶). نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که ایزوله های سودوموناس ESBLs مثبت به ترتیب از نمونه های بالینی خون (۳۲٪) و ادرار (۲۲/۷٪) جداسازی گردیدند. به نظر می رسد استفاده از ابزارهای تهاجمی از جمله کاتترهای ادراری، وریدی در بروز و انتشار عفونت های ناشی از این ارگانیسم های مقاوم نقش دارد. همچنین در این مطالعه اکثر ایزوله های سودوموناس ESBLs مثبت از بیماران بستری در بخشهای مراقبت ویژه (۴۴٪) و داخلی (۲۵/۳٪) جمع آوری شدند. بستری طولانی مدت بیماران در بخش های بحرانی بیمارستانی از جمله ICU، وخیم بودن حال بیماران، مواجهه بیماران با آنتی بیوتیک های وسیع الطیف و به کار بردن ابزارهای تهاجمی درمانی مثل تراشه و کاتتر به نظر می رسد از دلایل عمده شیوع ارگانیزمهای مقاوم باشد.

با انجام آزمون PCR بر روی ایزوله های تولید کننده ESBLs از مجموع ۱۳۶ (۷۷/۳۷٪) ایزوله سودوموناس آئروژینوزای مولد ESBLs، ۱۸ ایزوله (۱۳٪) حامل ژن *bla_{OXA-1}*، ۱۲ ایزوله (۸٪) حامل ژن *bla_{OXA-4}*، ۱۲ ایزوله (۸٪) حامل ژن *bla_{GES-1}* و ۱۴ ایزوله (۱۰٪) حامل ژن *bla_{VEB-1}* بودند. در مطالعه ای که توسط میرصالحیان و همکاران در سال ۲۰۱۰ به بررسی تولید ESBLs بر روی سودوموناس آئروژینوزا انجام گرفت، ژن *bla_{OXA-10}* (۷۴/۶۲٪)، ژن *bla_{PER-1}* (۴۹/۲۵٪) و ژن *bla_{VEB-1}* (۳۱/۳۴٪) دارای الگوی ESBLs مثبت بودند (۱۰۸). در بررسی که در سال ۲۰۱۴ توسط فرشادزاده و همکاران بر روی سودوموناس آئروژینوزا انجام شد، ژن *bla_{PER-1}* (۵۴/۱۶٪) و ژن *bla_{OXA-10}* (۷۵/۶۸٪) مثبت بودند (۱۰۳). در بررسی که در سال ۲۰۰۹ توسط شاهچراغی و همکاران بر روی ۶۰۰ ایزوله بالینی سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از دو بیمارستان

در تهران انجام شد، ژن bla_{VEB-1} (۲۴٪)، ژن bla_{PER-1} (۱۷٪) و ژن bla_{GES-1} (۰) مثبت بودند (۱۱۰). در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۵ توسط Lee و همکاران در کره جنوبی بر روی ۲۵۲ نمونه بالینی سودوموناس آئروژینوزا صورت پذیرفت، مشخص شد که ژن bla_{OXA-10} (۱۳/۱٪)، ژن bla_{OXA-4} (۴/۳٪) و ژن bla_{OXA-2} (۲/۳٪) مثبت بودند (۱۱۱).

۶-۲- نتیجه گیری:

توجه به حضور قابل توجه ایزوله های سودوموناس آئروژینوزا مولد ESBL و الگوی افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی سودوموناس آئروژینوزا لزوم تشخیص این آنزیم ها و تعیین الگوی دقیق حساسیت آنتی بیوتیکی این ایزوله ها جهت گزارش به بالین و اعمال راهکارهای مناسب درمانی و کنترل عفونت ضروری می باشد.

۶-۳- پیشنهادات:

- ۱- پیشنهاد می گردد سایر ژنهای کد کننده ESBL از جمله PSE مورد بررسی قرار گیرد.
- ۲- تعیین الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به سایر آنتی بیوتیک های مصرفی و بررسی فاکتورهای ملکولی کد کننده آنها ضروری است.

تشکر و قدردانی

از شورای مرکزی مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی قزوین و معاونت محترم پژوهشی تقدیر می شود.

١. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, &Adelberg's medical microbiology: McGraw-Hill Medical New York, NY, USA; 2007: p. 216-226.
٢. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity.2011; 13; 2: 150.
٣. Malekzade F, and M. Shahamat. General Microbiology, Second Edition ed. 2005.
٤. Pitt,T.L, Simpson, A.J.H. Principles and Practice of Clinical Bacteriology.2nded. 2006. P:427-443.
٥. Mandell GL. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 2005: p. 1023-35.
٦. Gillespie SH, Hawkey PM. Principles and practice of clinical bacteriology: Wiley Online Library; 2006: p. 421-43.
٧. Walker, T.s. Microbiology Payvand Mehr. Tehran. 2008
٨. Harris, A. D., M. Kotetishvili, S. Shurland, J. A. Johnson, J. G. Morris, L. L. Nemoy, and etal. How important is patient to patient transmission in extended- spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* acquisition. *Am J Infect Control*. 2007. 2: 101 -3597.
٩. Grage K, Rehm BH. In vivo production of scFv-displaying biopolymer beads using a self-assembly-promoting fusion partner. 2008;19(1):254-62.
١٠. Hancock RE, Brinkman FS. Function of *pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol*. 2002;56: 17-38.
١١. Biswas S, Mohammad MM, Patel DR, Movileanu L, van den Berg B. Structural insight into OprD substrate specificity. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14(11):1108-9.
١٢. Li H, Luo YF, Williams BJ, Blackwell TS, Xie CM .Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: from antibiotic resistance to novel therapies. 2012;302(2):63-8.

١٣. Ochs MM, Bains M, Hancock RE. Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(7):1983-5.
١٤. Tamber S, Hancock RE. Involvement of two related porins, OprD and OpdP, in the uptake of arginine by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;260(1):23-9
١٥. Murate T, Gotoh N, Nishino T. Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. *FEMS Microbiol Lett*. 2002; 217(1): 57063.
١٦. Chevalier S, Bodilis J, Jaouen T, Barray S, Feuilloley MG, Orange N. Sequence diversity of the OprD protein of environmental *Pseudomonas* strains. *Environ Microbiol*. 2007;9(3):824-35.
١٧. Pirnay JP, De Vos D, Mossialos D, Vanderkelen A, Cornelis P, Zizi M. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* oprD gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol*. 2002;4(12):872-82.
١٨. Farra A, Islam S, Strålfors A, Sörberg M, Wretling B. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *Int J Antimicrob Agents*. 2008;31(5):427-33.
١٩. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*. 2007; 67: 351-368.
٢٠. Caille O, Rossier C, Perron K. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2007;189(13):4561-8.
٢١. Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL, Köhler T. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 2004 5;279(10):8761-8.
٢٢. Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(3):1211-21.
٢٣. Kwon DH, Lu CD. Polyamine effects on antibiotic susceptibility in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(6):2070-7.

٢٤. Washington C. Winn, Stephen D. Allen, Stephen Allen, William M Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger, Gary W. Procop, Gail L. Koneman's color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology, Gail Woods, 6th Edition, 2006.p;256-285.
٢٥. Hemati Y. Pathogenic bacteria in humans, Third ed. Shahid Beheshti University.
٢٦. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology: with STUDENT CONSULT Online Access: *Elsevier Health Sciences*; 2009: p. 421-43.
٢٧. Mann EE, Wozniak DJ. *Pseudomonas* biofilm matrix composition and niche biology. 2012;36(4):893-916.
٢٨. Ojeniyi B, Frederiksen B, Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* cross-infection among patients with cystic fibrosis during a winter camp. *Pediatr Pulmonol*. 2000;29(3):177-81.
٢٩. Wagner VE, Iglewski BH. *P.aerogiosa* Biofilms in CF Infection. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2008;35(3):124-34.
٣٠. Pritt B, O'Brien L, Winn W. Mucoid *Pseudomonas* in cystic fibrosis. 2007;128(1):32-4.
٣١. Nowroozi J, Akhavan Sepahi A, Rashnonejad A. Pyocyanine Biosynthetic Genes in Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and Detection of Pyocyanine's Antimicrobial Effects with or without Colloidal Silver Nanoparticles. 2012;14(1):7-18.
٣٢. Sudhakar T, Karpagam S and Shiyama S. Analysis Of Pyocyanin Compound And Its Antagonistic Activity Against Phytopathogens. 2013;3:p1101-1106.
٣٣. Forbes BA, SahmDF, Weissfeld AS, TrevionEA. Bailey & scotts. Diagnostic Microbiology.12thed. st.LouisMO, *Elsevier Mosby*;2007.385-405.
٣٤. Allewelt M, Coleman FT, Grout M, prebe GP, pier GB: "Acquisition of expression of *the pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin. Leads to increased bacterial virulence in a murine model of a cute pneumonia and systemic spread."Infection and immunity. 2000;68: 3998-4004.
٣٥. Molina DN, Colón M, Bermúdez RH, Ramírez Ronda CH. Unusual presentation of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a review. *Bol Asoc Méd P R*. 1991;83(4):160-3.
٣٦. Beckett G, Williams D, Giberson G, Gensheimer K, Gershman K, Shillam P, et al. *Pseudomonas dermatitis/folliculitis* associated with pools and hot tubs-Colorado and Maine, 1999-2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 2000;49(48):1087-91.

୩୭. Willcox MD, Holden BA. Contact lens related corneal infections. *Biosci Rep*. 2001 Aug;21(4):445-61.
୩୮. Mowat G. An international collaborative study on foot and mouth disease virus assay methods. 1. Virus infectivity and neutralizing antibody assays. *Journal of biological standardization*. 1984;12(4):399-411.
୩୯. Eifrig CW, Scott IU, Flynn HW, Jr., Miller D. Endophthalmitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Ophthalmology*. 2003 Sep;110(9):1714-7.
୪୦. Rajashekaraiah K, Dhawan VK, Rice TW, McCulley D, Kallick CA. Increasing incidence of *Pseudomonas* endocarditis among parenteral drug abusers. *Drug and Alcohol Dependence*. 1980;6(4):227-30.
୪୧. Berthelot P, Grattard F, Mahul P, Pain P, Jospe R, Venet C, et al. Prospective study of nosocomial colonization and infection due to *Pseudomonas aeruginosa* in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med*. 2001 Mar;27(3):503-12.
୪୨. Edwards-Jones V, Greenwood JE. What's new in burn microbiology? James Laing Memorial Prize Essay 2000. *Burns*. 2003 Feb;29(1):15-24.
୪୩. Morrison AJ, Wenzel RP. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Review of Infectious Diseases*. 1984;6(Supplement 3):S627-S42.
୪୪. Ryan KJ, Ray CG. Sherris medical microbiology: McGraw Hill Medical; 2010.
୪୫. Sonensyn SW , Gerding DN. Antimicrobials for treatment of respiratory infection in respiratory infection. 2000;43: 511-519.
୪୬. Paul M, Lador A, Grozinsky-Glasberg S, Leibovici L. Beta lactam antibiotic monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside antibiotic combination therapy for sepsis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;1:Cd003344.
୪୭. Tang Y-W, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clinical Chemistry*. 1997;43(11):2021-38.
୪୮. Baron EJ. Conventional versus Molecular Methods for Pathogen Detection and the Role of Clinical Microbiology in Infection Control. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(9 Supplement):S43-S.
୪୯. "Genotyping definition". NIH. Retrieved 2011;09-21.

- ١. Gierczynski R., Jagielski M., Rastawicki W. and Kaluzewski S. Multiplex-PCR Assay for Identification of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Carrying the *cps* Loci for k1 and k2 Capsule Biosynthesis. *Journal of Microbiology*. 2007; 56(3):153-156.
- ٢. Balfanz J., Rautenberg P. and Ullmann U. Molecular mechanisms of action of bacterial exotoxins. *Zentralbl Bakteriologie*. 1996; 284:170-206.
- ٣. Buffenmeyer C.L., Ruchek R.R. Bacteriocin (Klebocin) sensitivity typing of *Klebsiella*. *J. Clin. Microbiol.* 1976; 4:239-244.
- ٤. Speert D P. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Biosci.* 2002; (7):354-61.
- ٥. Foley L, Lynne M A, Nayak R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect. Genet. Evol.* 2009; (9):430-440.
- ٦. Pfaller M A. Molecular epidemiology in the care of patients. *Arch Pathol. Lab Med.* 1999; (123):1007-1010.
- ٧. Wu F, La-Latta P. Molecular typing strategies. *Semin. Perinatol.* 2002;(26):357-366.
- ٨. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific American*. 1990;262(4):56-61.
- ٩. Trindade PA, McCulloch JA, Oliveira GA, Mamizuka EM. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. *Braz J Infect Dis.* 2003 Feb;7(1):32-43.
- ١٠. Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect.* 2002 Nov;8(11):694-704.
٦١. Baek KT, Frees D, Renzoni A, Barras C, Rodriguez N, Manzano C, Kelley WL. Genetic Variation in the *Staphylococcus aureus* H30 Strain Lineage Revealed by Whole-Genome Sequencing. *PLoS One*. 2013 Sep 30;8(9):e77122.
٦٢. Koeuth T, Versalovic J, Lupski JR. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Res.* 2005 Nov;15(4):408-18.
٦٣. Singh A, Goering RV, Simjee S, Foley SL, Zervos MJ. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jul;19(3):512-30.

٦٣. Clark NM, Patterson J, Lynch JP 3rd. Antimicrobial resistance among, gram-negative organisms in the intensive care unit. *Curr Opin Crit Care*. 2003;9(5):413-23.
٦٤. Guglielmo B.J, editor . Infectious disorder. In: Koda-Kimble M.A, Young L.Y, Kradjan W, A Guglielmo B.J, Alldredge BK, Corelli R.L, editors. Applied therapeutics, the Clinical use of drugs, 8thed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2005. P.56.23-4.
٦٥. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm. 2005; 18(2):306-25.
٦٦. Docquier JD, Luzzaro F, Amicosante G, Toniolo A, Rossolini GM. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. *Emerg Infect Dis*. 2001;7(5):910-1.
٦٧. Nordmann P, Naas T, Fortineau N, Poirel L. Superbugs in the coming new decade; multidrug resistance and prospects for treatment of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.* and *Pseudomonas aeruginosa* in 2010. *Curr Opin Microbiol*. 2007;10(5):436-40.
٦٨. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Yagi T, Kato H, Arakawa Y. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*. 2003; 6;362(9399):1888-93.
٦٩. Kim C, Villegas-Estrada A, Hesek D, Mobashery S. Mechanistic characterization of the bifunctional aminoglycoside-modifying enzyme AAC(3)-Ib/AAC(6')-Ib' from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*. 2007 ;1;46(17):5270-82.
٧٠. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. B-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2005; 8: 525-533.
٧١. Ang JY^١, Ezike E, Asmar BI .Antibacterial resistance. *Indian J Pediatr*. 2004Mar;71(3):229-39.
٧٢. Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, et al. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(4):827-830.
٧٣. Alm RA, Mattick JS. Genes involved in the biogenesis and function of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene*. 1997;192(1):89-98.

٧٤. Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 1998 Jul 3;273(27):16792-7.
٧٥. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, et al. Metallo-beta-lactamases: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2):30.
٧٦. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(11):4783-4788.
٧٧. Van EHI and Dubos R. Unearthing antibiotics. *J Exp Med*. 2006 Feb 20; 203(2): 259.
٧٨. Łeski TA, Tomasz A. Role of penicillin-binding protein 2 (PBP2) in the antibiotic susceptibility and cell wall cross-linking of *Staphylococcus aureus*: evidence for the cooperative functioning of PBP٧, PBP٤, and PBP2A. *J Bacteriol*. 2005 Mar;187(5):1815-24.
٧٩. Smith RG. Penicillin and cephalosporin drug allergies: a paradigm shift. *J Am Podiatr Med Assoc*. 2008 Nov-Dec;98(6):479-88.
٨٠. Van Delden C, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis*. 1998 Oct-Dec;4(4):551-60.
٨١. Thomason KS, Listerv PD. Other beta- lactamas antibiotics. In: Gorbach SL, Bartlett JC, lacklow NR. Infectious diseases. 3th Ed. Baltimore, Williams and Wilkins. 2004; P: 204-208.
٨٢. Al-Jasser AM. Extended- spectrum- lactamase (ESBL): aglobal problem. *Kuwait Med J*. 2006; 38(3): 171- 185.
٨٣. Samuelsen O, Buarø L, Giske CG, Simonsen GS, Aasnaes B, Sundsfjord A. Evaluation of phenotypic tests for the detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a low prevalence country *J Antimicrob Chemother*. 2008 Apr;61(4):827-30
٨٤. Mendiratta DK, Deotale V, Narang P. Metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a hospital from a rural area. *Indian J Med Res*.2005; 121: 701-703.
٨٥. Fred CT. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *American J Med*. 2006; 119 (6): 3–10.
٨٦. Siegel MD, Robert E, Emerging Gram-Negative Antibiotic Resistance: Daunting Challenges, Declining Sensitivities, and Dire Consequences. *Respiratory Care*. 2008; 53: 4.

٨٧. Hamud-Socoro AA. *Pseudomonas aeruginosa* resistance to tetracycline and triclosan. *Cantaurus*. 2004; 12: 7-9.
٨٨. Maschmeyer G, Braveny I. Review of the Incidence and prognosis of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cancer patients in the 1990s. *Eur J clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 19: 915- 925.
٨٩. Aeschlimann JR. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Society of Infectious. *Pharmacotherapy*. 2003; 23(7):916-924.
٩٠. Hawkey PM. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. *BMJ*. 1998; 317:657-660.
٩١. Abigail AS, Dixie D. Revenge of the microbes; how bacterial resistance is undermining the antibiotic miracle. 2005; p: 80-90.
٩٢. Barza M. Potential mechanisms of increased disease in humans from antimicrobial resistance in food animals. *Clin Infect Dis*. 2002; 34(3): 123–125.
٩٣. Takeda S, Nakai T, Wakai Y, Ikeda F, Hatano K. In vitro and in vivo activities of a new cephalosporin, FR264205, against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(3):826-30.
٩٤. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S20. CLSI, Wayne, PA. 2010. 40: 2755-2759.
٩٥. Fazeli H, Akbari R, Moghim S, Asadian A, Faghihinia J, Saneeyan H. Detection of morphotyping characteristics Identification antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *IJMS*. 2012;29(171):212-8.
٩٦. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*. 2000 May 19;288(5469):1251-4.
٩٧. Baltch A, Hammer M, Smith R, Sutphen N. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: susceptibility of 100 blood culture isolates to seven antimicrobial agents and its clinical significance. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1979;94(2):201-14.
٩٨. Hodson ME. Antibiotic treatment aerosol therapy. *Chest Journal*. 1988;94(2_Supplement):156S-60S.

٩٩. Sadeghi A, Rahimi B, Shojapour M. Molecular detection of metallo- β -lactamase genes *bla*_{VIM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2} and *bla*_{SPM-1} in *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from hospitalized patients in Markazi province by Duplex-PCR. *African J Microbiol* 2012; 6(12): 2965-2969.
١٠٠. Imani Fooladi AA, Rostami Z, Shapouri R. Antimicrobial resistance and ESBLprevalence in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from clinical specimen by phenotypic and genotypic methods, Zanjan, Iran. *Iranian J MedMicrobiol*. 2011; 10: 189-198.
١٠١. Saderi H, Lotfalipour H, Owlia P, Salimi H. Detection of Metallo- β -Lactamase Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Burn Patients in Tehran, Iran. 2010; 41: 10.
١٠٢. Sibhghatulla Shaikh, Jamale Fatima, Shazi Shakil, Syed Mohd. Danish Rizvi, Mohammad Amjad Kamal. Prevalence of multidrug resistant and extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2014; 1: 62–64.
١٠٣. Farshadzadeh Z, Khosravi AD, Alavi SM, Parhizgari N, Hoveizavi H. Spread of extended-spectrum β -lactamase genes of *bla*_{OXA-10}, *bla*_{PER-1} and *bla*_{CTX-M} in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns*. 2014; 40(8): 1575- 80.
١٠٤. Rehab Mahmoud Abd El-Baky, Nehal Hussein Abd El-Azeim and Gamal Fadel Mahmoud Gad. Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase, AmpC Beta-Lactamase, and Metallo-Beta-Lactamase among Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Advanced Biotechnology and Bioengineering*. 2013; 1: 22-29.
١٠٥. Vahdani M^١, Azimi L, Asghari B, Bazmi F, Rastegar Lari A. Phenotypic screening of extended-spectrum β -lactamase and metallo- β -lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *Ann Burns Fire Disasters*. 2012; 30: 78-81.
١٠٦. Farhat Ullah, Salman Akbar Malik, Jawad Ahmed. Antimicrobial susceptibility and ESBL prevalence in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the North West of Pakistan. *Burns*. 2009; 35: 1020-1025.
١٠٧. Jiang X, Zhang Z, Li M, Zhou D, Ruan F, Lu Y. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(9): 2990-5.

۱۰۸. Mirsalehian A, Feizabadi M, Nakhjavani FA, Jabalameli F, Goli H, Kalantari N. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns*. 2010; 36(1):70-4.
۱۰۹. AlipourTanaz, SadeghifardNourkhoda. Incidence of extended spectrum beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* and frequency of *bla*_{OXA-2} and *bla*_{OXA-10} genes. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2010; 4(8): 3202-3207.
۱۱۰. Shacheraghi Fereshteh, Shakibaie Mohammad Reza. Molecular identification of ESBL genes *bla*_{GES-1}, *bla*_{VEB-1}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-4}, *bla*_{OXA-10} and *bla*_{PER-1} in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients by PCR, RFLP and sequencing techniques. *Int J Bio Life Sciences*, 2010; 6: 3.
۱۱۱. Lee S^۱, Park YJ, Kim M, Lee HK, Han K, Kang CS, Kang MW. Prevalence of Ambler class A and D beta-lactamases among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Korea. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(1):122-7.
۱۱۲. Naas T, Benaoudia F, Massuard Set al. Integron-located VEB-۱ extended-spectrum beta-lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46: 703–11.
۱۱۳. De Champs C, Poirel L, Bonnet Ret al. Prospective survey of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a French hospital in 2000. *Antimicrob Agents Chemother*.2002;46: 3031–4.
۱۱۴. Aubert D, Poirel L, Chevalier Jet al. Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*2001;45: 1615–20.
۱۱۵. Poirel L, Le Thomas I, Naas Tet al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*.2000;44: 622–32.
۱۱۶. Aghazadeh M, Rezaee MA, Nahaei MR, Mahdian R, Pajand O, Saffari F, et al. Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microb Drug Resist*. 2013;19(4):282-8.

١١٧. Erol S, Altoparlak U, Akcay MN, Celebi F, Parlak M. Changes of microbial flora and wound colonization in burned patients. *Burns*. 2004; 30(4):357-61.
١١٨. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(2):306-25.
١١٩. Shih-Ping Lin, Meei-Fang Liu, Chin-Fu Lin, Zhi-Yuan Shi. Phenotypic detection and polymerase chain reaction screening of extended-spectrum β -lactamases produced by *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Ann Burns Fire Disasters*. 2012; 30:78-81.
١٢٠. Workentine ML, Sibley CD, Glezerson B, Purighalla S, Norgaard-Gron JC, Parkins MD, Rabin HR, Surette MG. Phenotypic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* populations in a cystic fibrosis patient. 2013;8(4):248-252.
١٢١. Glupczynski Y, Bogaerts P, Deplano A, Berhin C, Huang TD, Van Eldere J, et al. Detection and characterization of class A extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Belgian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(5):866-71.
١٢٢. Babic M, Hujer AM, Bonomo RA. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. *Drug Resist Updat*. 2006;9(3):142-56.
١٢٣. Docquier JD, Luzzaro F, Amicosante G, Toniolo A, Rossolini GM. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 extended-spectrum serine-beta-lactamase and VIM-2 metallo-beta-lactamase. 2001;7(5):910-1
١٢٤. Moya, B., Zamorano, L., Juan, C., Pérez, J.L., Ge, Y., Oliver, A. Activity of a new cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected in vitro and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2010; 54, 1213–1217.
١٢٥. Begum S, Salam MA, Alam KF, Begum N, Hassan P, Haq JA. Detection of extended spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas spp.* isolated from two tertiary care hospitals in Bangladesh. *BMC Research Notes*. 2013;6(1):7.
١٢٦. S S, Reddy AS, S S, C A, V S, Ms K, et al. Resistance Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in a Tertiary Care Hospital of Kanchipuram, Tamilnadu, India. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(5):Dc30-2.

١٢٧. Zafer MM, Al-Agamy MH, El-Mahallawy HA, Amin MA, Ashour MS. Antimicrobial resistance pattern and their beta-lactamase encoding genes among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cancer patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014: 101635.
١٢٨. Umadevi S, Joseph NM, Kumari K, Easow JM, Kumar S, Stephen S, et al. Detection of extended spectrum beta lactamases, ampc beta lactamases and metallobetalactamases in clinical isolates of ceftazidime resistant *Pseudomonas Aeruginosa*. *Braz J Microbiol*. 2011;42(4):1284-8.
١٢٩. Woodford N, Zhang J, Kaufmann ME, Yarde S, Tomas Mdel M, Faris C, et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing VEB-type extended-spectrum beta-lactamases in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(6):1265-8.

ضمیمه ۱

تهیه نیم مک فارلند : استاندارد نیم مک فارلند سولفات باریوم به روش زیر تهیه می شود :

۱. ۰/۵ میلی لیتر از کلرور باریوم (BACL) ۰/۰۴۸ mol/l ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ۱/۱۷۵ W/V (%) را به ۹۹/۵

میلی لیتر اسیدسولفوریک ۰/۱۸ mol/l (۱% V/V) اضافه کنید و با هم زدن مداوم سوسپانسیون بدست

آورید .

۲. چگالی صحیح کدورت استاندارد با استفاده از اندازه گیری جذب در اسپکتروفوتومتر با طول مسیر نوری ۱

سانتی متر، مشخص شود. جذب در ۶۲۵ نانومتر باید بین ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ باشد.

۳. سوسپانسیون سولفات باریوم باید به مقدار ۴-۶ ml در لوله های در پیچ دار هم اندازه با لوله های

سوسپانسیون باکتریایی ریخته شود.

۴. درب این لوله ها باید محکم بسته شود و در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شود .

۵. استاندارد سولفات باریوم قبل از هر بار استفاده باید بشدت (ترجیحا با ورتکس مکانیکی) همزده شود، تا

کدورت یکنواختی ایجاد گردد. در صورت مشاهده ذرات بزرگ، باید استاندارد تازه ای تهیه گردد.

۶. استاندارد سولفات باریوم باید بصورت ماهانه جایگزین شود یا جذب آن اندازه گیری گردد.

ضمیمه ۲

TBE بافر: ۵۴ گرم تریس را با ۲۷/۵ گرم بوریک اسید در ۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل کرده سپس ۲۰ میلی لیتر EDTA (۰/۵ مولار) به آن اضافه کرده و حجم را به یک لیتر میرسانیم.

ضمیمه ۳

EDTA (۰/۵ مولار): ۱۸/۱۶ گرم EDTA در ۱۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل کرده و pH را با استفاده از NaOH به ۸ رسانده و سپس توسط اتوکلاو استریل میکنیم.

Abstract

Background and aims: *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most common nosocomial pathogens. Along with the advent of different patterns of drug resistance, the extended spectrum β -lactamases (ESBLs) have been increasingly reported as a major clinical concern. The main aim of the present study was to determine the distribution of *bla*_{OXA}, *bla*_{VEB-1}, and *bla*_{GES-1}-genes among clinical isolates of *P. aeruginosa*.

Methods: In this study, a total of 156 ESBL-producing isolates were collected from the patients admitted to the educational hospitals. Phenotypic detection of ESBLs and antimicrobial susceptibility testing were performed according to the clinical and laboratory standards institute (CLSI) guideline. PCR and sequencing were employed to detect *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-2}, *bla*_{OXA-3}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{GES-1}, and *bla*_{VEB-1} genes. Genetic relationship of isolates was evaluated by repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) method.

Results: In total, 136 (87.2%) of ESBL-producing isolates showed multidrug resistance pattern. The *bla*_{OXA-1} (36%) was the most common gene, followed by *bla*_{OXA-2} (32%), *bla*_{GES-1} (17%), and *bla*_{VEB-1} (14%). The REP-PCR findings demonstrated three different genotypes and the most common genotype found was type A (88%) followed by B (6%) and C (6%).

Conclusions: Our present study found a significant presence of ESBLs among clonally related *P. aeruginosa* isolates which highlights the need for establishing suitable infection control strategies to effectively treat patients and prevent the further distribution of these resistant organisms. This is the first report of *bla*_{OXA-2} and *bla*_{OXA-10} genes in *P. aeruginosa* isolates in Iran.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *bla*_{OXA}, *bla*_{VEB-1}, *bla*_{GES-1}, REP-PCR

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *bla*_{OXA}, *bla*_{VEB-1}, *bla*_{GES-1}, REP-PCR



Qazvin University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

Thesis submitted for

Master of Science degree in medical microbiology

Title:

Frequency of ESBLs OXA, GES- λ and VEB- λ and molecular
typing REP-PCR in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from
Hospitals in Qazvin and Tehran

Supervisor: Dr. Amir Peymani

Advisor: Dr. Amir Javadi

By: Sahar Amirkamali

Year of graduation:

Registration number: